



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

**“Redução da toxicidade e aumento da
biodegradabilidade dos efluentes do cozimento da
cortiça através da integração de tecnologias de
membrana e ozonização”**

Diana Cardoso Marques dos Santos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Arlindo Gomes

Covilhã, Maio de 2013

*“O verdadeiro homem mede a sua força,
quando se defronta com o obstáculo.”
Antoine de Saint-Exupéry*

Agradecimentos

À Fundação para a Ciência e Tecnologia, pelo financiamento da bolsa de investigação, BI-1-PTDC/AGR-AAM/102042/2008, a qual me permitiu a realização da dissertação de mestrado. À Universidade da Beira Interior, à Unidade de Materiais Têxteis e Papeleiros (UMTP) e ao Departamento de Química por me terem disponibilizado todas as condições necessárias ao desenvolvimento deste trabalho e a oportunidade de divulgação do meu trabalho nos Simpósios da UMTP.

Ao meu orientador, Professor Dr. Arlindo C. Gomes, pelo conhecimento transmitido, por toda a disponibilidade, paciência, compreensão, incentivo e apoio na realização deste trabalho. À Professora Dr. Lúcia Silva, pela disponibilidade, apoio e colaboração durante a realização desta investigação.

Ao Professor Dr. Rogério Simões, ao Professor Dr. António Albuquerque, à Professora Dr. Ana Carreira e à Dr. Annabel Fernandes pela total disponibilidade e cooperação.

Aos meus colegas de laboratório, em particular ao Roberto Fernandes, pela total disponibilidade, ajuda e pela experiência e conhecimentos transmitidos.

A todos os professores que fizeram parte deste percurso e da minha formação académica, em especial ao Professor Dr. António Mendonça e à Professora Dr. Cândida Tomaz, por todo o apoio prestado enquanto diretores de curso de 1º e de 2º ciclo em Bioquímica, respetivamente.

A todos os meus amigos e colegas de curso, pela amizade e companheirismo. Em especial, à Rita Ramos por todo o apoio e carinho e à Dália Santos pela amizade e pronta disponibilidade e ajuda.

Ao meu namorado, pelo carinho, amor e paciência intermináveis, por todo o apoio, incentivo e presença.

E, por fim, aos mais importantes: ao meu pai, por todas as lições valiosas, pela confiança que sempre depositou em mim, por me mostrar que eu era forte e capaz, pelo otimismo, motivação, apoio e carinho, por ter estado sempre presente mesmo que distante; à minha mãe, por ter sido incansável, pela sua força, por todos os conselhos, pelo apoio, incentivo e amor incondicionais; ao meu irmão, pela alegria e boa disposição contagiantes, pelo alento, cumplicidade, amizade e carinho.

A esta cidade neve, que me acolheu durante 5 anos e me proporcionou momentos únicos que levo no coração e a todos os que contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo

A operação de cozimento da cortiça, destinada à purificação da matéria-prima, requer elevados consumos específicos de água e origina um efluente com cor escura intensa, composição complexa e elevada carga orgânica. Porém, a rentabilidade da produção e transformação da cortiça podem ser beneficiadas se a indústria reduzir o consumo de água e as emissões poluentes. Esta investigação iniciou-se com a recolha e caracterização de uma amostra de efluente, a qual confirmou uma carga poluente elevada, carência química de oxigénio (CQO) de $1\,536\text{ mg L}^{-1}$ e de fenóis totais (FT) de $110\text{ mg ácido tânico L}^{-1}$, e valores de carência bioquímica de oxigénio após 5 e 20 dias de incubação de $407\text{ mg O}_2\text{ L}^{-1}$ e $554\text{ mg O}_2\text{ L}^{-1}$, respetivamente, ou seja com razões CBO_5/CQO e $\text{CBO}_{20}/\text{CQO}$ de 0.26 e 0.36, respetivamente; as quais limitam a possibilidade de concretizar a depuração através de processos biológicos.

A utilização sequencial de membranas de ultrafiltração (UF) com coeficiente de exclusão molecular (CEM) de 100, 50, 20 e 10 kDa permitiu obter o fracionamento dos compostos orgânicos em função da sua dimensão molecular, obtendo-se no final das operações em descontinuo 5 frações contendo os poluentes superiores a 100 kDa, entre 50-100 kDa, 20-50 kDa e 10-20 kDa e inferiores a 10 kDa. A caracterização das frações permitiu obter a distribuição mássica da CQO, FT e cor, a qual determinou que os compostos com dimensão superior a 50 kDa são responsáveis por 72% da CQO, 81% dos FT e 83% da cor do efluente. Concluiu-se que a biodegradabilidade, toxicidade (Microtox), e os valores de CQO, FT e cor podem ser correlacionados com a dimensão e com os CEM das membranas.

Os resultados da oxidação química das frações com ozono, limitado a razões $\text{Ozono}_{\text{aplicado}}/\text{CQO}_{\text{inicial}}$ entre 0.15 e 0.60, permitiram remoções da CQO, FT e cor entre 16.6 e 69.4%, 67.7 e 95.7% e entre 10 e 96.5%, respetivamente; e o aumento a biodegradabilidade, a qual é primariamente limitada pela dimensão.

O recurso à cromatografia de alta resolução (HPLC) com detetores de diodo array (DAD) e de espetrometria de massa permitiu quantificar 7 poluentes específicos e confirmar que a natureza e composição complexa do efluente e das frações permitem a ocorrência de reações de clivagem, degradação e associação, algumas favorecidas pelo ozono, que resultaram em razões de recuperação (todas as frações incluídas) expressas em percentagem, entre 0 e 415%.

Os resultados obtidos permitem suportar a viabilidade técnica e económica da integração da UF, oxidação química e tratamento biológico nos sistemas de depuração do efluente do cozimento da cortiça, contribuindo assim para a redução do consumo de água através da possibilidade de reutilização dos permeados.

Palavras-chave:

Efluente do cozimento da cortiça; Biodegradabilidade; Toxicidade; Membranas de UF; Fracionamento; Ozonização.

Abstract

The cork boiling operation used to purify the raw material requires high consumption of water and originates an intense dark colored effluent, with complex composition and high organic load. However, the cork production and transformation profitability can be increased if the industry manages to minimize the consumption of water and the release of pollutants. This investigation began with the collection and characterization of an effluent sample, which showed to be very rich in pollutants, with an Chemical Oxygen Demand (COD) of $1\,536\text{ mg L}^{-1}$, an Biochemical Oxygen Demand (BOD) of $407\text{ mg O}_2\text{ L}^{-1}$ and $554\text{ mg O}_2\text{ L}^{-1}$ after 5 and 20 days of incubation respectively and with Total Phenols (TP) of $110\text{ mg of tannic acid L}^{-1}$; with BOD_5/COD and $\text{BOD}_{20}/\text{COD}$ ratios of 0.26 and 0.36 respectively; which limit the possibility of achieving the depuration through biological procedures.

The sequential use of ultrafiltration (UF) membranes with molecular weight cut off (MWCO) of 100, 50, 20 and 10 kDa allowed us to obtain the fractionation of organic compounds according its molecular dimension, resulting in 5 fractions at the end of the discontinuous operations, with pollutants larger than 100 kDa, between 50-100 kDa, 20-50 kDa, 10-20 kDa and smaller than 10 kDa. The characterization of these fractions allowed obtaining the mass distribution of COD, TP and color, which determined that compounds with dimension over 50 kDa are responsible for 72% of total COD, 81% of TP and 83% of the effluent's color. It was concluded that biodegradability, toxicity (Microtox®) and the values of COD, TP, and color can be correlated with the dimension and the MWCO of the membranes.

The results of the fractions chemical oxidation with ozone, limited to ratios of $\text{O}_3\text{ app}/\text{COD}_i$ between 0.15 and 0.60, allowed removals of COD, TP and color between 16.6 and 69.4%, 67.7 and 95.7% and between 10 and 96.5%, respectively and the increase of biodegradability, which is primarily limited by dimension.

The use of High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) with diode array detectors (DAD) and mass spectrometry allowed the quantification of 7 specific pollutants and confirm that the complex nature and composition of the effluent and the fractions allow the occurrence of cleavage, degradation and association reactions, some of them favored by the ozone, which result in recuperation ratios (all fractions included) express in percentage, between 0 and 415%.

The obtained results support the technical and economical viability of UF, chemical oxidation and biological treatment integration in the depuration system of cork boiling wastewater, anticipating also the possibility of permeates reuse allowing water consumption reduction.

Keywords:

Cork boiling wastewater; Biodegradability; Toxicity; UF Membranes; Fractionation; Ozonation.

Índice

| | |
|---|----|
| 1. Introdução | 19 |
| 2. Revisão Bibliográfica | 21 |
| 2.1 Produção e Transformação de Cortiça | 21 |
| 2.2 Efluente do cozimento da cortiça: caraterização | 23 |
| 2.3 (Eco)Toxicidade | 25 |
| 2.4 Biodegradabilidade: aeróbia..... | 27 |
| 2.5 Depuração do efluente do cozimento da cortiça | 30 |
| 2.5.1 Tratamento Biológico | 30 |
| 2.5.2 Tratamento Físico-Químico | 30 |
| 3. Materiais e Métodos..... | 36 |
| 3.1 Recolha e Conservação do Efluente de Cozedura da Cortiça | 36 |
| 3.2 Procedimentos Experimentais..... | 37 |
| 3.2.1 Pré-Tratamento | 37 |
| 3.2.2 Ultrafiltração..... | 37 |
| 3.2.3 Oxidação química com Ozono | 40 |
| 3.3 Determinações analíticas e Equipamentos | 41 |
| 3.3.1 Carência Química de Oxigénio (CQO) | 42 |
| 3.3.2 Carbono Orgânico Total (COT) | 43 |
| 3.3.3 Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO) | 43 |
| 3.3.4 Toxicidade | 44 |
| 3.3.5 Fenóis Totais | 45 |
| 3.3.6 HPLC-DAD | 46 |
| 3.3.7 LC-MS | 46 |
| 3.3.8 Determinação do Ozono Solúvel | 47 |
| 3.4 Reagentes | 48 |
| 3.5 Recolha e conservação de biomassa | 48 |
| 4. Resultados experimentais: tratamento e discussão..... | 49 |
| 4.1 Caraterização do efluente do cozimento da cortiça | 49 |
| 4.2 Fracionamento por UF | 54 |
| 4.3 Oxidação química..... | 60 |
| 4.4 Progressão do perfil fenólico das frações antes e após a ozonização | 65 |
| 5. Considerações finais | 70 |
| 5.1 Perspetivas futuras | 71 |
| Bibliografia..... | 73 |

| | |
|---------------|----|
| Anexos | 79 |
| Anexo 1 | 79 |
| Anexo 2 | 82 |
| Anexo 3 | 83 |
| Anexo 4 | 86 |

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 2.1: Fluxograma genérico do processo produtivo do setor corticeiro..... | 22 |
| Figura 2.2: Exemplos de estruturas de ácidos fenólicos | 24 |
| Figura 2.3: Possibilidade de biodegradação de taninos hidrolisáveis (A) e flavonóides (B) por diferentes enzimas. | 25 |
| Figura 2.4: Representação das etapas de ligação proteína-polifenol: formação de precipitados..... | 26 |
| Figura 2.5: Representação esquemática de testes respirométricos: (A) Sistema OxiTop e (B) Sistema Sapromat. | 29 |
| Figura 3.1: Esquema representativo da unidade piloto de filtração utilizada nos ensaios de UF..... | 38 |
| Figura 3.2: Diagrama esquemático do fracionamento sequencial de UF..... | 39 |
| Figura 3.3: Esquema representativo do equipamento utilizado na ozonização..... | 41 |
| Figura 3.4: Equipamento utilizado nas determinações de CBO | 44 |
| Figura 3.5: Equipamento utilizado na avaliação da ecotoxicidade | 45 |
| Figura 4.1: Cromatograma do efluente do cozimento da cortiça por HPLC-DAD, considerando as absorvências na região do UV-visível (220-600 nm) | 52 |
| Figura 4.2: Variação do fluxo de permeado normalizado, ao longo do tempo (h) necessário para atingir um FRV igual a 4. | 55 |
| Figura 4.3: Perfis mássicos de distribuição da CQO, FT e cor. | 59 |
| Figura 4.4: Índices de biodegradabilidade e razão CBO_5/CBO_{20} das frações de UF. | 60 |
| Figura 4.5: Variação da biodegradabilidade para as razões (A) CBO_5/CQO e (B) CBO_{20}/CQO com a razão $O_3 \text{ aplicado}/CQO_{\text{inicial}}$ | 64 |
| Figura 4.6: Cromatogramas de HPLC-DAD da amostra de efluente do cozimento da cortiça inicial e ao fim de 11 dias de arejamento e agitação.. | 67 |
| Figura 4.7: Estruturas moleculares do (A) ácido gálico e do (B) ácido tânico. | 68 |
| Figura 4.8: Cromatogramas de HPLC-DAD da mistura reacional com 600 mg L^{-1} de ácido gálico (11.05 minutos) e 60 mg L^{-1} de glucose (não detetada), antes e após 1h de reação, com formação de ácido tânico (52.30 minutos).. | 68 |
| Figura A1: Reta de calibração utilizada para quantificação de Fenóis Totais | 83 |
| Figura A2: Reta de calibração utilizada para quantificação do ácido gálico | 83 |
| Figura A3: Reta de calibração utilizada para quantificação do ácido protocatecuico | 84 |
| Figura A4: Reta de calibração utilizada para quantificação do aldeído protocatecuico | 84 |
| Figura A5: Reta de calibração utilizada para quantificação do ácido siringico | 84 |
| Figura A6: Reta de calibração utilizada para quantificação do aldeído vanílico | 85 |
| Figura A7: Reta de calibração utilizada para quantificação do ácido elágico | 85 |
| Figura A8: Reta de calibração utilizada para quantificação do ácido tânico | 85 |
| Figura A9: Correlação entre a CQO dos permeados obtidos no processamento sequencial de UF e o coeficiente de exclusão molecular..... | 86 |
| Figura A10: Correlação entre os fenóis totais dos permeados obtidos no processamento sequencial de UF e o coeficiente de exclusão molecular..... | 86 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 2.1: Distribuição mundial das áreas de floresta de sobreiro e produção anual de cortiça de cada país. | 21 |
| Tabela 2.2: Caracterização média do efluente de cozimento da cortiça comparada com os valores legais permitidos para descarga em cursos naturais de água. | 24 |
| Tabela 2.3: Informação relativa a alguns dos testes ecotoxicológicos. | 27 |
| Tabela 2.4: Exemplos de métodos baseados na oxidação química testados na depuração do efluente do cozimento da cortiça. | 32 |
| Tabela 2.5: Exemplos de métodos físico-químicos aplicados na depuração do efluente do cozimento da cortiça. | 33 |
| Tabela 2.6: Exemplos de métodos integrados aplicados na depuração do efluente do cozimento da cortiça. | 35 |
| Tabela 3.1: Descrição das determinações analíticas efetuadas e amostras alvo. | 42 |
| Tabela 4.1: Resultados da Caracterização do efluente do cozimento da cortiça. | 49 |
| Tabela 4.2: Identificação e quantificação de alguns compostos fenólicos presentes no efluente do cozimento da cortiça. | 53 |
| Tabela 4.3: Condições Operacionais e coeficientes de permeabilidade da água das membranas de UF utilizadas no fracionamento do efluente do cozimento da cortiça. | 54 |
| Tabela 4.4: Variação da rejeição das membranas para a sequência de fracionamento concretizada através de membranas de UF. | 56 |
| Tabela 4.5: Volume e características do efluente do cozimento da cortiça e das frações obtidas, após fracionamento sequencial por UF. | 57 |
| Tabela 4.6: Variação do pH, CQO, FT, A254, A580, razão estequiométrica e retenção do ozono obtidos nos ensaios de ozonização com as frações. | 61 |
| Tabela 4.7: Razões de recuperação (%) de poluentes específicos, após o fracionamento e a ozonização, de acordo com as quantidades de ozono aplicadas (todas as frações incluídas). | 66 |
| Tabela A1: Descrição da composição do meio da biomassa aeróbia. | 82 |

Lista de Acrónimos

| | |
|--------------------|---|
| A254 | Absorvência a 254 nm, compostos aromáticos; |
| A580 | Absorvência a 580 nm, cor; |
| CBO | Carência Bioquímica de Oxigénio; |
| CBO ₂₀ | Carência Bioquímica de Oxigénio ao fim de 20 dias de incubação; |
| CBO ₅ | Carência Bioquímica de Oxigénio ao fim de 5 dias de incubação; |
| CEM | Coeficiente de Exclusão Molecular; |
| COT | Carbono Orgânico Total; |
| CQO | Carência Química de Oxigénio; |
| EC ₅₀ | Concentração Efetiva 50%; |
| <i>f</i> | Coeficiente de Rejeição; |
| FRV | Fator de Redução de Volume; |
| FT | Fenóis Totais; |
| HPLC | Cromatografia Líquida de Alta Performance; |
| HPLC-DAD | Cromatografia Líquida de Alta Performance acoplada a detetor <i>Diode Array</i> ; |
| LC-MS | Cromatografia Líquida de Alta Performance acoplada a espectroscopia de massa; |
| Lp ^{água} | Coeficiente de Permeabilidade da Água Pura; |
| Lp | Coeficiente de Permeabilidade nos ensaios com efluente; |
| MF | Microfiltração; |
| NF | Nanofiltração; |
| OR | Osmose Reversa; |
| POA's | Processos de Oxidação Avançados; |
| PTM | Pressão Transmembranar; |
| SS | Sólidos Suspensos; |
| TCA | 2,4,6-tricloroanisol; |
| TM | Tecnologia de Membrana; |
| TR | Taxa de Recuperação; |
| UF | Ultrafiltração; |
| UT | Unidade Tóxica; |
| UV | Ultravioleta; |

1. Introdução

A cortiça é um material natural, renovável e biodegradável produzido a partir da casca do sobreiro (*Quercus suber* L.) e usado principalmente para produzir materiais de construção e rolhas (Pereira, 2007). Cerca de 15% da produção é convertida em rolhas, o produto mais valioso e popular, responsável por dois terços das receitas do setor (Yan Lan et al., 2008).

A produção de cortiça é uma atividade estritamente regulada e sustentável que contribui para a preservação de mais de 2.2 milhões de hectares de ecossistema florestal natural que é típico nos países do Mediterrâneo. Portugal lidera a produção e a transformação de cortiça, apresentando uma produção anual média de cerca de 100 mil toneladas, ou seja, 50% da produção mundial (APCOR, 2012).

A atual competição entre a cortiça e os materiais sintéticos para a produção de rolhas pode ser superada caso a produção de cortiça e sua transformação sejam apreendidas pelos consumidores como atividades ambientais sustentáveis. No entanto, a primeira fase do processamento industrial da cortiça, focada na limpeza, desinfecção e humedecimento da matéria-prima, requer elevados consumos específicos de água e resulta na emissão de um efluente escuro e com uma elevada carga orgânica. A operação de cozimento da cortiça inicia-se após a extração e secagem e é concretizada através da imersão em água quente, a temperatura próxima da ebulição, durante uma hora (Insa et al, 2006). A possibilidade de reutilização da água é limitada pelo aumento da concentração dos compostos extraídos, nomeadamente ácido fenólicos, 2,4,6-tricloroanisole (TCA) e compostos derivados (Benítez et al, 2006), alguns dos quais estão potencialmente relacionados com degradação do vinho, durante o armazenamento. A composição complexa do efluente, a sua reduzida biodegradabilidade e elevada toxicidade (Dias-Machado, 2005) determinam que a depuração através de tratamento biológico seja insuficiente para cumprir os requisitos da legislação ou para gerar oportunidades para valorização.

Neste contexto, torna-se urgente investigar opções de tratamento dos efluentes da operação de cozimento com viabilidade técnica e económica e que contribuam para salvaguardar e consolidar a posição da cortiça como produto “amigo do ambiente”.

O estudo realizado insere-se num projeto de investigação financiado pela FCT (PTDC/AGR-AAM/102042/2008) destinado a avaliar uma solução integrada para a depuração e potencial reutilização do efluente do cozimento da cortiça. Ao longo desta investigação, foram estudadas várias opções para a integração de tecnologias, nomeadamente o recurso às tecnologias de membrana (TM), ultrafiltração (UF) e nanofiltração (NF), à oxidação química com ozono, e tratamento biológico em lagoas macrófitas. Nesta dissertação a experimentação realizada e os resultados obtidos dizem respeito à integração da UF com a ozonização para

obter o incremento da biodegradabilidade e a redução da toxicidade dos concentrados e a avaliação das características dos permeados relativamente aos limites da legislação ou para valorização da água.

O presente trabalho é constituído por 5 capítulos:

1. “Introdução”, que permite uma contextualização do trabalho;
2. “Revisão bibliográfica”, que reúne a informação mais relevante sobre a produção e transformação da cortiça, caracterização do efluente do cozimento da cortiça e dos resultados obtidos de depuração por diversas tecnologias;
3. “Materiais e Métodos”, que expõe os métodos analíticos, procedimentos, materiais e equipamentos utilizados em cada etapa deste estudo;
4. “Resultados experimentais: tratamento e discussão”, onde são apresentados e discutidos os resultados obtidos;
5. “Considerações finais”, que evidencia as principais conclusões obtidas e apresenta sugestões para um trabalho futuro.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Produção e Transformação de Cortiça

A cortiça é um material natural, renovável e biodegradável extraído da casca do sobreiro (*Quercus suber* L.) e que apresenta propriedades únicas, nomeadamente para produção de materiais para isolamento (construção) e de vinhos (rolhas) (Pereira, 2007).

O sobreiro cresce principalmente em regiões do Mediterrâneo Ocidental - Portugal, Espanha, Sul de França, Itália, Norte de África - ocupando uma área total de cerca de 2.2 milhões de hectares. Em Portugal, os sobreiros encontram-se disseminados por todo o território nacional, com predominância na zona do Alentejo, ocupando um total de 716 mil hectares e determinando a liderança na produção (tabela 2.1), com cerca de 50% do total mundial (APCOR, 2012).

Tabela 2.1 Distribuição mundial das áreas de floresta de sobreiro e produção anual de cortiça de cada país (adaptado de APCOR, 2012).

| País | Área (hectares) | Produção Anual (toneladas) |
|----------|-----------------|----------------------------|
| Portugal | 715 922 | 100 000 |
| Espanha | 574 248 | 61 504 |
| Marrocos | 383 120 | 11 686 |
| Argélia | 230 000 | 9 915 |
| Outros | 215 799 | 18 353 |
| Total | 2 119 089 | 201 428 |

O ciclo de vida da cortiça, enquanto matéria-prima, começa com a extração da casca aos sobreiros - descortiçamento - que ocorre no final da Primavera ou no início do Verão, quando a árvore se encontra fisiologicamente ativa. Este processo é sujeito a um rigoroso enquadramento legal, o qual determina que o descortiçamento só pode ser realizado por volta dos 25 a 30 anos do sobreiro, pois o tronco deve atingir um perímetro de cerca de 70 cm, quando medido a 1.5 metros do solo (APCOR, 2012). Após o descortiçamento, os sobreiros requerem nove anos para desenvolver a cortiça e permitirem uma nova colheita. Em termos médios, a exploração de cortiça é viável durante mais de 200 anos, o que corresponde a cerca de 16 extrações e permite uma importante fixação de dióxido de carbono (CO₂), estimada em cerca de 1.8 g de CO₂ por cada grama de cortiça (Mendonça et al., 2007).

Tanto no primeiro como no segundo descortiçamento, a cortiça obtida apresenta características impróprias para a produção de rolhas. Assim, apenas a partir do terceiro

descortiçamento é que se obtém a cortiça com as propriedades adequadas para a produção de rolhas de qualidade, uma vez que já apresenta uma estrutura regular (APCOR, 2012).

Na figura 2.1, encontra-se o diagrama do processo produtivo do setor corticeiro.

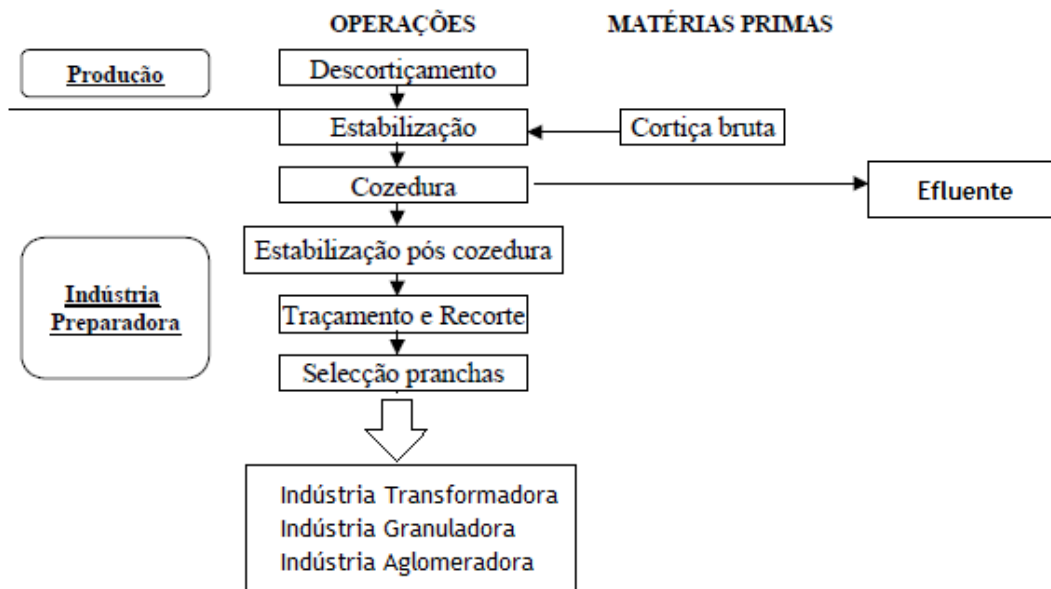


Figura 2.1: Fluxograma genérico do processo produtivo do setor corticeiro (Adaptado de Dias-Machado, 2005).

Após o descortiçamento, as pranchas de cortiça devem ficar em repouso ao ar livre, durante um período mínimo de seis meses com o objetivo de maturação da matéria-prima, decomposição da lignina, redução da humidade, oxidação dos polifenóis e estabilização da cortiça (Dias-Machado et al., 2006; APCOR, 2012).

A próxima etapa é o cozimento da cortiça, que consiste na imersão das pranchas de cortiça em água limpa e a ferver (100 °C), durante uma hora (Benítez et al., 2006). Este processo tem como objetivos limpar a cortiça, extrair-lhe as substâncias hidro-solúveis, aumentar a sua espessura e assim reduzir a densidade e torná-la mais macia e elástica (Dias-Machado et al., 2006; APCOR, 2012).

O volume de água utilizado no cozimento da cortiça pode variar de indústria para indústria; contudo, a reutilização da água de cozimento da cortiça para a produção de rolhas deve ser limitada, com o objetivo de se assegurar a ausência de contaminantes orgânicos nas rolhas (nomeadamente cloroanisóis e clorofenóis), potencialmente responsáveis pela deterioração dos vinhos durante o armazenamento (Insa et al., 2006). Isto porque, quanto maior for o teor de compostos extratáveis na água, menor será o poder da água para purificar a cortiça. Assim, de acordo com a literatura, a quantidade de água consumida no cozimento de uma

tonelada de cortiça é cerca de 400 litros, o que corresponde, para Portugal, à produção de 40 000 m³ de efluente (Dias-Machado et al., 2006; APCOR, 2012).

Na próxima etapa do processamento da cortiça ocorre a estabilização, que se estende por um período de duas a três semanas com o objetivo de aplanar as pranchas e permitir o seu repouso, desta forma pretende-se obter a consistência necessária para a sua transformação em rolhas (APCOR, 2012). Seguidamente, as pranchas de cortiça são cortadas de acordo com a espessura e tamanhos pretendidos e, mediante as características das pranchas, estas são classificadas e agrupadas em diferentes classes.

Dependendo do tipo de produto, o tratamento final e a seleção podem ser mais ou menos minuciosos. No caso da transformação em rolhas, que são o produto mais valioso da indústria correspondendo a dois terços das receitas da indústria, a seleção e o acabamento devem ser muito exigentes (Yan Lan et al., 2008). Quando finalizado o processamento, as rolhas devem ser embaladas em sacos de plástico repletos de SO₂ (anidrido sulfuroso), um gás inibidor do desenvolvimento microbológico (APCOR, 2012).

2.2 Efluente do cozimento da cortiça: caracterização

O problema dos efluentes líquidos do setor da cortiça manifesta-se sobretudo ao nível das águas de cozedura, as quais contêm os compostos extraídos que são responsáveis pela coloração escura e intensa (Benítez et al., 2008 (a); Benítez et al., 2008 (b); Vilar et al., 2009). Na tabela 2.2 apresentam-se e comparam-se as principais características do efluente com os valores exigidos pela legislação para descarga de águas residuais em meios recetores naturais.

A fração fenólica extraída contribui para o pH moderadamente ácido, valores de carência química de oxigénio (CQO) elevados e de carência bioquímica de oxigénio (CBO) reduzidos e, consequentemente uma biodegradabilidade reduzida (Dias-Machado, 2005).

As águas de cozimento de cortiça são misturas complexas de extratos vegetais com mais de 50 compostos orgânicos que conferem uma coloração escura e intensa ao efluente (Fernandes et al., 2011). Entre outros compostos naturais, estas águas apresentam concentrações elevadas de polifenóis como sejam ácidos fenólicos, taninos, TCA, pentaclorofenol e ácidos cinâmicos (Dias-Machado, 2005). Segundo Minhalma e de Pinho (2001), os ácidos fenólicos mais abundantes na água de cozedura da cortiça são o gálico, o protocatecuico, o vanílico, o sirínico, o ferúlico e o elágico. Na figura 2.2 encontram-se alguns exemplos de estruturas de ácidos fenólicos comuns.

Tabela 2.2: Caracterização média do efluente de cozimento da cortiça comparada com os valores legais permitidos para descarga em cursos naturais de água (adaptado de Dias-Machado, 2005).

| Parâmetro (unidades) | Efluente de cozimento da cortiça | | Valor máximo admissível ³ |
|---|---------------------------------------|-----------------------------|---|
| | Intervalo de variação ¹ | Valores médios ² | |
| pH | 4,5 - 5,5 | 5 | 6,0 - 9,0 |
| CQO (mg O ₂ L ⁻¹) | 1 600 - 5 500 | 5 093 | 150 |
| CBO ₅ (mg O ₂ L ⁻¹) | 356 - 1 800 | 1 124 | 40 |
| CBO ₅ /CQO | 0,22 - 0,32 | 0,22 | - |
| Fenóis (mg fenol L ⁻¹) | 0,4 - 0,7 | 0,6 | 0,5 |
| Polifenóis (mg ácido tânico L ⁻¹) | 600 - 900 | 857 | - |
| Cor | Visível na diluição 1:20 | Visível na diluição 1:20 | Não visível na diluição 1:20 |
| Sulfatos (mg SO ₄ L ⁻¹) | 100 - 150 | 151 | 2 000 |
| Nitratos (mg NO ₃ L ⁻¹) | 10 - 15 | 13 | 50 |

¹⁾ ANIEC - Associação Nacional dos Industriais e Exportadores da Cortiça ⁽²⁾ CTCOR - Centro Tecnológico da Cortiça ⁽³⁾ Decreto de lei nº.236/98, de 1 de Agosto

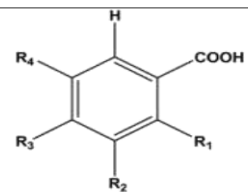
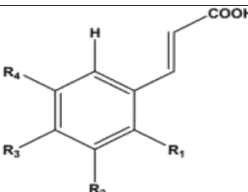
| Ácidos Hidrobenzóicos | | Estruturas mais comuns | | | |
|---|---|------------------------|------------------|----------------|------------------|
| | | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ |
|  | Ácido benzóico | H | H | H | H |
| | Ácido vanílico | H | OCH ₃ | OH | H |
| | Ácido gálico | H | OH | OH | OH |
| | Ácido protocatéquico | H | OH | OH | H |
| | Ácido siríngico | H | OCH ₃ | OH | OCH ₃ |
| Ácidos Hidroxicinâmicos |  | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | Ácido cinâmico | H | H | H | H |
| | Ácido o-cumárico | OH | H | H | H |
| | Ácido ferúlico | H | OCH ₃ | OH | H |
| | Ácido sinápico | H | OCH ₃ | OH | OCH ₃ |
| | Ácido cafeico | H | OH | OH | H |

Figura 2.2 Exemplos de estruturas de ácidos fenólicos (Adaptado de Da Piedade Silva, 2011).

Apesar das propriedades tóxicas e bacteriostáticas dos compostos fenólicos, estes podem ser degradados por algumas bactérias como *Achromobacter* sp., *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp., *Klebsiella* sp. E *Citrobacter* sp., através de oxidação e hidrólise enzimática, como ilustra a figura 2.3 (Mingshu et al., 2006).

fenólicos simples, a flavonoides e taninos condensados altamente polimerizados, o que dificulta a sua caracterização, quantificação e estudo, aspeto agravado pelo facto da composição química variar de planta para planta. Frequentemente, estes compostos são identificados como inibidores do crescimento de microrganismos contribuindo para a defesa das plantas, pelo que são resistentes à oxidação biológica, dificultando o tratamento das águas residuais. Além disso, os polifenóis oxidam-se rapidamente em água, reduzindo substancialmente o teor de oxigénio dissolvido disponível para o normal desenvolvimento da fauna e da flora (Dias-Machado, 2005).

A toxicidade destes compostos na nutrição animal está associada à sua capacidade de formar complexos com proteínas, característica que é agravada pela dimensão e insolubilidade que favorecem a formação de complexos polifenol-proteína ilustrados na figura 2.4 (Dias-Machado, 2005 e Monteleone et al., 2004). No caso de microrganismos, a toxicidade dos polifenóis pode estar associada a diversos mecanismos, tais como a inibição de enzimas, a privação de substrato, a perda de iões metálicos, a inibição da respiração celular ou, em alguns casos, a indução de alterações na morfologia celular (Dias-Machado, 2005 e Mingshu et al., 2006).

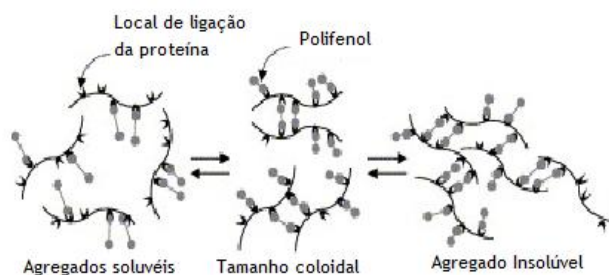


Figura 2.4 Representação das etapas de ligação proteína-polifenol: formação de precipitados (Adaptado de Monteleone et al., 2004).

Assim, a avaliação do impacto ambiental destes compostos ou de efluentes onde estes estejam presentes deve também incluir a toxicidade.

A apreciação da capacidade de um efluente produzir um efeito nocivo sobre o ciclo de vida ou no metabolismo de um organismo vivo do meio aquático é estudada através da realização de ensaios ecotoxicológicos. Estes baseiam-se em respostas específicas fornecidas por organismos uni e multicelulares - bioindicadores - expostos à amostra. Os bioindicadores bacterianos são dos mais utilizados, pois permitem um resultado rápido; no caso de toxicidade aguda, produzem dados mensuráveis em apenas alguns minutos, o que os elege como ideais para uma primeira abordagem à avaliação da qualidade da água. O resultado obtido pode ser expresso em EC_{50} , isto é, a concentração à qual 50% da população exposta não apresenta nenhuma resposta à amostra a que foi apresentada, ou em Unidades de

Toxicidade (UT) que corresponde à razão $100/EC_{50}$ (C. Santos, 2011). Na tabela 2.3, encontra-se informação resumida sobre os testes mais utilizados na avaliação da toxicidade.

Tabela 2.3 Informação relativa a alguns dos testes ecotoxicológicos (adaptado C. Santos, 2011).

| Testes ecotoxicológicos | Reinos | Bioindicador | Tipo de resposta / Parâmetro medido | Tempo de resposta |
|-------------------------|----------------------|----------------------------------|--------------------------------------|-------------------|
| Microtox | Bacteria | <i>Vibrio fischeri</i> | Luminiscência | < 1h |
| SOS Chromotest | Bacteria | <i>E. coli</i> | Actividade enzimática | 1-2h |
| ToxAlert | Bacteria | <i>Vibrio fischeri</i> | Luminiscência | --- |
| Protoxkit F | Protozoa | <i>Tetrahymena thermophila</i> | Inibição do crescimento | 24 h |
| GreenScreen | Fungi | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Densidade celular | 24h |
| Algaltoxkit F | Algae | <i>Selenastrum capricornutum</i> | Inibição do crescimento | 72 h |
| Rotoxkit F | Animalia (rotífero) | <i>Brachionus calyciflorus</i> | Toxicidade aguda | 24 h |
| Rotoxkit M | Animalia (rotífero) | <i>Brachionus plicatilis</i> | Toxicidade aguda | 24-48 h |
| Artoxkit M | Animalia (crustáceo) | <i>Artemia franciscana</i> | Toxicidade aguda | 24-48 h |
| Ceridaphtoxkit F | Animalia (crustáceo) | <i>Ceriodaphnia dubia</i> | Toxicidade aguda | 12-24h |
| Daphtoxkit F magna | Animalia (crustáceo) | <i>Daphnia magna</i> | Toxicidade aguda | 24-48 h |
| Thamnotoxkit F | Animalia (crustáceo) | <i>Thamnocephalus platyurus</i> | Toxicidade aguda | 24 h |
| Ostracodtoxkit F | Animalia (crustáceo) | <i>Heterocypris incongruens</i> | Inibição do crescimento, mortalidade | 6 d |

2.4 Biodegradabilidade: aeróbia

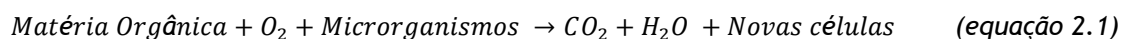
A toxicidade dos compostos presentes nos efluentes pode causar um decréscimo no consumo de oxigénio, devido à inibição da respiração celular. Quando isto acontece, a carência bioquímica de oxigénio (CBO) e a respetiva biodegradabilidade diminuem. A avaliação da biodegradabilidade pode ser concretizada através de dois índices, correspondendo à razão entre o oxigénio consumido por microrganismos aeróbios após 5 ou 20 dias de incubação

relativamente ao valor obtido para a mesma amostra através da oxidação química, ou seja, da CQO; assim, obtêm-se, respetivamente, as razões CBO₅/CQO e CBO₂₀/CQO (Roppola, 2009).

Uma substância ou composto é biodegradável quando suscetível a decomposição pela ação dos microrganismos que podem usar estes compostos como fonte de energia para regular o respetivo metabolismo, concretizar a biossíntese e multiplicação (Dimitrov et al., 2007).

Em contraste com as propriedades físico-químicas, que podem ser definidas de modo único para uma dada estrutura molecular, a biodegradabilidade não é uma característica intrínseca dos compostos. Em vez disso, a biodegradação é um parâmetro variável afetado tanto pela estrutura molecular e química, como pelas condições experimentais sob as quais o ensaio é realizado (Dimitrov et al., 2007).

Na presença de oxigénio, os microrganismos convertem a matéria orgânica biodegradável em dióxido de carbono (CO₂), água (H₂O) e energia, através da oxidação biológica (equação 2.1) (Wagland et al., 2009).



Na ausência de oxigénio a biodegradação da matéria orgânica pode ser concretizada por microrganismos anaeróbios (biodegradação anaeróbia). Em ambos os casos os resultados obtidos, consumo de oxigénio ou produção de biogás, são utilizados para avaliar a biodegradabilidade de compostos químicos ou de efluentes, desde que sejam mantidas as condições de temperatura, pH, razão C:N:P, macro e micronutrientes apropriadas (Buendía et al., 2008).

Deste modo, os ensaios de biodegradabilidade são ferramentas essenciais para a avaliação do impacto ambiental dos compostos químicos orgânicos ou dos efluentes. Relativamente à biodegradação aeróbia, existem diversas metodologias possíveis, nomeadamente a determinação de taxas cinéticas de produção de dióxido de carbono ou do valor de oxigénio consumido, designado por CBO (Dimitrov et al., 2007).

A CBO tem a vantagem de ser um parâmetro biológico direto da degradação aeróbia, que indica a eliminação de uma substância orgânica da água, e permite conclusões indiretas sobre a biodegradação. Convencionalmente, esta pode ser medida por titulação iodométrica ou por eletrodo de oxigénio; contudo, estes métodos são trabalhosos e demorados, podendo ainda ser imprecisos, caso a diluição escolhida seja incorreta (Roppola, 2009).

Os testes respirométricos aeróbios são utilizados para caracterizar compostos orgânicos tendo como princípio a medição do oxigénio consumido e do dióxido de carbono produzido/dissolvido (equação 2.1). Estes testes têm um período de incubação entre 5 a 28 dias e podem

ser classificados como estáticos ou dinâmicos. No primeiro caso, a amostra não sofre arejamento ao longo do ensaio, enquanto no segundo tipo de teste a amostra é arejada minimizando os problemas de limitação de oxigénio (Wagland et al., 2009).

Os testes manométricos são métodos recentes e inovadores que permitem medir a CBO de forma fiável. Estes baseiam-se na medição automática de pressão gerada pelo consumo de oxigénio e produção de dióxido de carbono, num frasco fechado sob temperatura e agitação constantes. Estes testes apresentam vantagens como redução do tempo de preparação de amostra, utilização de amostras sem diluição, leitura rápida e contínua dos dados (Roppola, 2009).

Existem dois testes respirométricos manométricos distintos: o OxiTop (WTW, Alemanha) e o sistema Sapromat (IBUK, Alemanha), os quais se encontram ilustrados na figura 2.5.

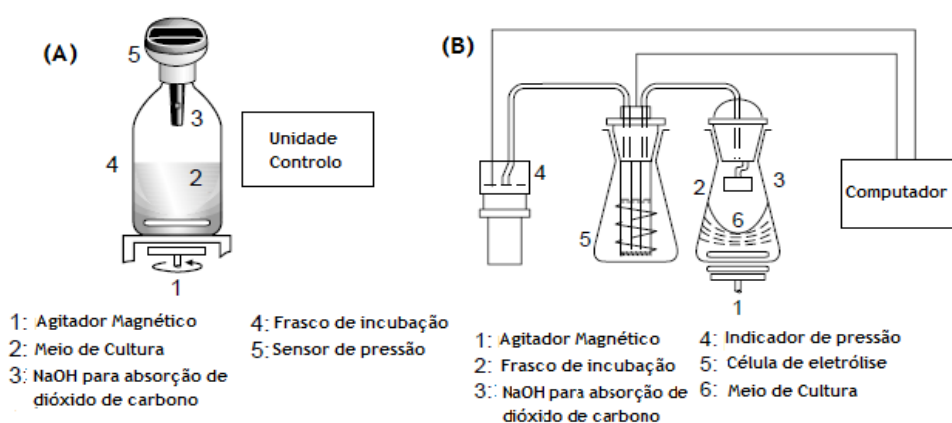


Figura 2.5: Representação esquemática de testes respirométricos: (A) Sistema OxiTop e (B) Sistema Sapromat (adaptado de Reuschenbach et al., 2003).

A principal distinção entre ambos os sistemas é o abastecimento de oxigénio, isto porque o sistema Sapromat é capaz de repor o que foi consumido na biodegradação através da produção eletroquímica do mesmo, caso uma subpressão seja atingida. Em sentido oposto, o sistema OxiTop não recorre à reposição de oxigénio, porém é necessário ter em conta se o volume livre no frasco de incubação (*headspace*) contém oxigénio suficiente para suportar a actividade do inóculo (Reuschenbach et al., 2003). Neste último caso, o oxigénio consumido é diretamente responsável pela oxidação/degradação da matéria orgânica, uma vez que o CO_2 produzido é absorvido por uma base (hidróxido de sódio-NaOH) (Wagland et al., 2009).

2.5 Depuração do efluente do cozimento da cortiça

As características do efluente do cozimento da cortiça (tabela 2.2), nomeadamente a cor intensa, reduzida biodegradabilidade e elevada toxicidade, determinam que ainda não existam estratégias para a depuração e redução do consumo de água com viabilidade técnica e económica suficientes para serem aceites pelos industriais.

2.5.1 Tratamento Biológico

Apesar da diversidade de situações, a revisão da literatura publicada revela valores para os índices de biodegradabilidade que variam entre 0.22 e 0.32 para a razão CBO_5/CQO , os quais são inferiores aos recomendados para tratamento biológico aeróbio (0.30) ou anaeróbio (0.40) (Metcalf e Eddy, 1991). Este constrangimento é agravado pelos valores de toxicidade aguda apresentados para a *V. fischeri*, entre 4.1 e 12.3 UT, os quais permitem classificar o efluente entre “moderadamente” (entre 1 e 5 UT) a “extremamente tóxico” (superior a 5 UT) (Bennett e Cuttage, 1992; Mendonça et al., 2004).

Os resultados publicados por Benítez et al (2003) para um sistema de lamas ativadas resultaram numa redução entre 13 e 37% da carga orgânica e através de culturas específicas de fungos os valores publicados por Mendonça et al (2004) situaram-se entre 50 e 60%. Neste contexto, são diversas as referências à dificuldade em obter a depuração do efluente exclusivamente através de processos biológicos de tratamento (Mendonça et al., 2004; Benítez et al., 2006; Benítez et al., 2008 (a) e Al Momani et al., 2010).

Atualmente, no âmbito do projeto de investigação “*Horizontal Subsurface Flow Constructed Wetlands for Cork Industry wastewater treatment*” decorrem ensaios para estabelecer o potencial de adaptação da biomassa presente em lagoas de macrófitas (*Phragmites australis*) ao tratamento do efluente do cozimento. Para operações com tempo de retenção hidráulico de 5 dias e efluente diluído (900 mg/L de CQO), contexto equivalente à operação com recirculação, as remoções obtidas variam entre 59 e 69%, após 300 dias (C. Santos et al.). Este processo de adaptação irá prosseguir até se estabelecer o limite para a carga orgânica.

2.5.2 Tratamento Físico-Químico

Atendendo às limitações dos processos biológicos anteriormente apresentadas, os tratamentos físico-químicos, nomeadamente os baseados na oxidação química (ozono, peróxido de hidrogénio, reagente de Fenton, etc.), surgem como opções viáveis para obter a remoção da carga orgânica e da cor e de complementarem o aumento da biodegradabilidade e reduzir a toxicidade. Todavia, a composição complexa e a presença de compostos recalcitrantes à oxidação química simples têm determinado a adoção de processos de oxidação avançados (POA's), os quais consistem na utilização de mistura de agentes oxidantes combinados com

radiação solar ou ultravioleta (UV) (Benítez et al., 2000). Na tabela 2.4, encontram-se resumidos os tratamentos físico-químicos baseados na oxidação química e os resultados mais relevantes obtidos no tratamento do efluente da operação de cozimento da cortiça.

Apesar dos resultados interessantes, nomeadamente na remoção da carga orgânica, cor e teor de fenóis totais (FT), estes tratamentos apresentam como principal desvantagem o consumo elevado das espécies químicas oxidantes, tais como Fe^{2+} (até 1.26 g L^{-1}), H_2O_2 (até 17 g L^{-1}) e Ozono (até 3.12 g L^{-1}), e requerem tempos de exposição prolongados à radiação UV e solar (até 28 dias, no caso de foto-Fenton solar) (Benítez et al., 2003; Guedes et al., 2003; Heredia et al., 2004 (a); Silva et al., 2004; Vilar et al., 2009 e Pintor et al., 2011). Todavia, a duração do tratamento e o consumo de agentes oxidantes podem ser reduzidos se os processos forem aplicados no âmbito do pré-tratamento do efluente cuja depuração será concluída através de processos de tratamento biológico.

A ozonização é um dos procedimentos de oxidação química mais utilizados, devido ao desenvolvimento de geradores de ozono em larga escala com custos de instalação e operação mais reduzido ($23,10 \text{ Euros kg}^{-1}$). Todavia, apesar do poder oxidante do ozono ser muito elevado ($E^0=2.1 \text{ V}$) o processo deve ser controlado, pois a seletividade é reduzida, podendo até ocorrer a formação de compostos que contribuam para aumentar o caráter biorecalcitrante e tóxico do efluente, após o tratamento.

O processo de ozonização é influenciado pelo pH da amostra. Perante um efluente de pH reduzido (<4), o mecanismo predominante da reação é o ataque eletrofílico direto pelo ozono molecular - ozonólise. Todavia, em solução aquosa a decomposição do ozono produz radicais hidroxilo (OH^\bullet) os quais apresentam um poder oxidante superior ($E^0=2,7 \text{ V}$). A participação dos radicais hidroxilo nas reações de oxidação aumenta, em função do pH da amostra desde 4 até 10, a partir do qual a ozonólise é suprimida (Hoigné e Bader, 1976). O mecanismo das reações de oxidação na presença de ozono dissolvido envolve os eletrões disponíveis em ligações insaturadas e ligações duplas conjugadas de compostos aromáticos.

O principal objetivo da associação de processos de oxidação química e biológica é a redução do consumo do agente oxidante necessário para que o efluente, após pré-tratamento, apresente características que permitam a conclusão da depuração por tratamento biológico, cuja operação é economicamente mais vantajosa (Al Momani et al., 2010; Oller et al., 2011).

Vários exemplos desta estratégia estão descritos na bibliografia, nomeadamente com efluentes da indústria de celulose (Balcioglu et al., 2006), lixiviados (Wu et al., 2004), agro-industriais (Martins et al., 2012) e com efluente do cozimento da cortiça, para o qual foram descritos incrementos de biodegradabilidade com ozono entre 13 e 55% (Benitez et al., 2003).

Tabela 2.4 Exemplos de métodos baseados na oxidação química testados na depuração do efluente do cozimento da cortiça.

| Métodos | Fundamento | Condições | Resultados | Referências |
|-------------------|--|--|--|--------------------------|
| Reação de Fenton | Fe^{2+} e H_2O_2 | $\text{Fe}^{2+} : \text{H}_2\text{O}_2 = 1 : 5$ $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10.6 \text{ g L}^{-1}$ T entre 20 e 50 °C pH = 3,2 | Redução CQO: até 87.3% Redução FT: até 66.4% Redução compostos aromáticos: até 70.2% Aumento da biodegradabilidade de 0.27 para 0.63 | Guedes et al., 2003 |
| | | Coeficiente estequiométrico $\frac{\text{g CQO}}{\text{g H}_2\text{O}_2}$ entre 0.08 e 0.43 | Reduções de CQO entre 17 e 79%; Eficiências de H_2O_2 entre 17 e 92% | Heredia et al., 2004 (a) |
| Ozonização | Ozono | Razão estequiométrica $\frac{\text{g substrato}}{\text{g Ozono}} = 0.56$ Pressão parcial = 3 kPa Tempo de retenção do Ozono = 3 h | Redução CQO: até 54% Redução FT: até 81% Redução compostos aromáticos: até 89% Aumento da biodegradabilidade de 0.60 para 0.93 Rendimento do ozono entre 40 e 61%; | Benítez et al., 2003 |
| Foto Oxidação | H_2O_2 / UV visível | $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.59 \text{ M}$ pH = 10 T = 35 °C t = 4 h | Redução de COT ⁽¹⁾ : até 39% | Silva et al., 2004 |
| | H_2O_2 / Fe^{2+} / UV visível | $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.31 \text{ M}$ $\text{Fe}^{2+} : \text{H}_2\text{O}_2 = 0.12 \text{ mol}$ pH = 3.2 t = 10 min | 66% de mineralização; | |
| | H_2O_2 / TiO_2 / UV visível | $[\text{TiO}_2] = 1 \text{ g L}^{-1}$ | Redução de COT: até 46% | |
| Solar Foto Fenton | H_2O_2 / Fe^{2+} / UV visível | $[\text{Fe}^{2+}]$ entre 20 e 80 mg L ⁻¹ | Mais de 90% de mineralização; | Pintor et al., 2011 |

⁽¹⁾ Carbono Orgânico Total (COT)

No contexto dos processos físico-químicos a revisão bibliográfica apresenta também referências à utilização de processos de coagulação floculação e tecnologias de membrana (TM) (tabela 2.5), os quais não promovem a eliminação da carga poluente, mas sim a sua acumulação numa lama ou num concentrado cujo tratamento e destino são frequentemente ignorados.

A tecnologia de membranas, dependendo do Coeficiente de Exclusão Molecular (CEM) da membrana utilizada, permite a remoção de compostos orgânicos de diferentes tamanhos moleculares, desde matéria suspensa por microfiltração (MF), macromoléculas por ultrafiltração (UF), pequenos solutos por nanofiltração (NF) até sais inorgânicos através de osmose reversa (OR). O mecanismo envolvido na remoção dos contaminantes da solução aquosa depende essencialmente da diferença de dimensão do poro relativamente aos solutos para as operações de MF e de UF, sendo que o desenvolvimento de interações entre os solutos rejeitados e o material da membrana aumentam com a seletividade da membrana. Assim, o desempenho das TM, avaliado pelo fluxo de permeado e rejeições obtidas, depende também da natureza e concentração dos solutos, da temperatura, pH, diferença de pressão através da membrana, etc. (Mulder, 1998).

Tabela 2.5 Exemplos de métodos físico-químicos aplicados na depuração do efluente do cozimento da cortiça.

| Método | Fundamento | Condições | Resultados | Referências |
|---------------------------|-------------------------------------|--|---|--------------------------|
| Coagulação/ Floculação | FeCl_3 e Ca(OH)_2 | $[\text{FeCl}_3] = 1\,000\text{ mg L}^{-1}$ | Redução CQO: até 45% Redução FT: até 71% Redução compostos aromáticos: até 58% | Peres et al., 2004 |
| Tecnologia de membranas | MF e UF | Membranas de MF de porosidade 0.65 e 0.1 μm (Dur 0.65 e Dur 0.1) Membranas de UF com CEM de 300 kDa (Bio 300K) $T = 20\text{ }^\circ\text{C}$ e PTM = 1.8 bar | Seletividade das membranas com a seguinte sequência: ácido elágico e cor > compostos aromáticos > taninos > CQO | Benítez et al., 2006 |
| | UF e NF | Membranas de UF com CEM entre 30 e 100 kDa Membranas de NF com CEM entre 150 e 300 Da | | Benítez et al., 2008 (a) |

Este processo tem-se mostrado muito efetivo, quando aplicado a efluentes industriais, pois a seletividade das membranas pode ser ajustada para se obter a concentração dos poluentes e,

frequentemente, permeados com qualidade compatível com a legislação ou suscetíveis de serem valorizados, através de recirculação ou reutilização, possibilitando uma redução do volume de água consumido.

As TM caracterizam-se ainda pela operação com custos reduzidos, elevada aplicabilidade, consumo reduzido de energia, facilidade de operação e de ajuste de condições e isenção de químicos (Mulder, 1998).

Deve-se ainda acrescentar que a possibilidade de integração deste com outros processos de depuração permite às indústrias cumprir com as exigências ambientais. Contudo, esta tecnologia apresenta também alguns inconvenientes, sendo o principal a colmatação ou *fouling* das membranas que resulta num decréscimo de fluxo, ao longo do processo. Este problema é agravado pela acumulação dos compostos rejeitados na vizinhança da membrana, fenómeno designado como polarização de concentração, resultando no desenvolvimento de uma resistência adicional. Por outro lado, a colmatação reversível ou irreversível dos resulta da deposição de materiais coloidais e de macromoléculas no interior dos poros da membrana, que ficam bloqueados, bem como pela adsorção de solutos (Mulder, 1998). De forma a evitar este constrangimento, têm sido utilizadas algumas estratégias, nomeadamente o pré-tratamento do efluente por floculação (Minhalma e de Pinho, 2011), ozonização (Benítez et al., 2008 (a)) e por MF convencional com filtros de porosidade entre 5 e 45 μm , que é a opção mais comum e prática (Benítez et al., 2006; Benítez et al., 2009; Teixeira et al., 2009 e Minhalma e de Pinho, 2011).

No caso do efluente do cozimento da cortiça, já foram aplicadas membranas de MF, UF e NF e, de acordo com a seletividade, obtiveram-se remoções de CQO entre 17 e 41% (para membranas de MF com porosidade entre 0.10 e 0.65 μm), entre 40 e 77% (para membranas de UF com CEM entre 3.8 e 10 kDa) e acima de 95% (para membranas de NF, em modo contínuo) (Benítez et al., 2006; Bernardo et al., 2009). Para operações em descontínuo com membranas de UF (com CEM de 5-20 kDa) e taxas de recuperação entre 50 e 92% obtiveram-se remoções de CQO entre 60-75% e descolorações entre 93 e 99%; com membranas de NF (com CEM de 150-800 kDa) as taxas de remoção foram acima de 94% (Benítez et al., 2008 (a); Teixeira et al., 2009). O principal objetivo da maioria destes estudos passou por avaliar a qualidade dos permeados, ignorando-se a composição e propriedades dos concentrados. Recentemente, Teixeira et al. (2009) testou com sucesso a viabilidade dos concentrados de NF (com um fator de redução de volume de 7) serem utilizados na indústria de curtumes, substituindo os extratos vegetais em 10% da produção de couro. Todavia, tendo em conta o volume de água consumida para o cozimento de cortiça (400 L ton^{-1}), o volume anual de efluente produzido ultrapassa os 40 000 m^3 , levando a que a quantidade de concentrado produzido, mesmo para operações com NF e aplicando uma taxa de recuperação elevada, ultrapasse largamente o atual consumo de soluções de extratos vegetais (taninos) utilizados na indústria de curtumes

(Mendonça et al., 2004; APCOR, 2012). Assim, continua a ser necessário investigar soluções para a depuração dos concentrados gerados pela tecnologia de membranas.

Devido à complexidade do efluente do cozimento da cortiça, a integração de diferentes metodologias é, frequentemente, sugerida para o seu tratamento. Na tabela 2.6 são indicados alguns exemplos de tratamentos integrados para a depuração desta água residual, descritos na literatura.

Tabela 2.6 Exemplos de métodos integrados aplicados na depuração do efluente do cozimento da cortiça.

| Método | Fundamento | Condições | Resultados | Referências |
|---------------------------------------|---|---|---|---------------------------------|
| Fenton/ Coagulação e Floculação | H_2O_2 / FeCl_3 e Ca(OH)_2 | $[\text{Fe}^{2+}] = 100 \text{ mg L}^{-1}$ $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.5 \text{ mol L}^{-1}$ | Redução CQO: até 74% Redução FT: até 94% Redução compostos aromáticos: até 98% | Peres et al., 2004 |
| | | $[\text{Fe}^{2+}]$ entre 0.001 e 0.2 mol L^{-1} $[\text{H}_2\text{O}_2]$ entre 0.06 e 1 mol L^{-1} | Redução CQO: até 85% Redução FT: até 98% Redução compostos aromáticos: até 97% | Heredia et al. 2004, (b) |
| Fenton/ Tratamento aeróbio | H_2O_2 / Fe^{2+} / UV visível | - | Redução de COT superiores a 90%; | Dias Machado et al., 2006 |

3. Materiais e Métodos

Neste capítulo encontram-se descritos os procedimentos experimentais e as determinações analíticas utilizadas na caracterização do efluente de cozedura da cortiça e das frações antes e após oxidação.

Para a concretização deste estudo foi necessária a recolha e conservação do efluente do cozimento da cortiça, como descrito no *subcapítulo 3.1*. Previamente aos ensaios de UF, o efluente foi submetido a um pré-tratamento com o intuito de remover a maioria dos sólidos suspensos (SS) e diminuir o risco de desgaste das membranas e o consequente decréscimo do seu desempenho. De seguida, o efluente foi fracionado através de membranas de UF e os concentrados gerados foram sujeitos a oxidação química com ozono. Todos estes procedimentos experimentais encontram-se descritos no *subcapítulo 3.2*.

As determinações analíticas, os equipamentos e os reagentes utilizados no decorrer deste trabalho estão indicados nos *subcapítulos 3.3 e 3.4*. Para a execução dos ensaios de biodegradabilidade aeróbia foi necessária a recolha, multiplicação e conservação da biomassa como descrito no *subcapítulo 3.5*.

O fracionamento da matéria orgânica presente no efluente foi concretizado sequencialmente recorrendo a membranas de UF com um Coeficiente de Exclusão Molecular (CEM) de 100 kDa, 50 kDa, 20 kDa e 10 kDa. O permeado proveniente do primeiro ensaio com a membrana de 100 kDa foi em seguida processado pela membrana com 50 kDa, mantendo-se a sequência até ser utilizada a membrana mais seletiva (10 kDa). As frações obtidas foram caracterizadas antes e depois de serem sujeitas a oxidação química com ozono. Através de HPLC-DAD foram quantificados alguns poluentes específicos, selecionados entre os anteriormente detetados em amostras de efluente e de cortiça. A toxicidade das amostras foi avaliada por exposição de diluições das amostras à bactéria luminescente *V. fischeri*, de acordo com o protocolo de toxicidade aguda do teste Microtox[®].

3.1 Recolha e Conservação do Efluente de Cozedura da Cortiça

O efluente de cozedura de cortiça utilizado neste estudo foi recolhido à saída de um tanque de equalização e homogeneização de uma indústria corticeira no distrito de Portalegre (Portugal) e conservado a -18°C, até ser utilizado. O efluente foi recolhido em Janeiro de 2012, sendo que 100 L foram utilizados na sequência de fracionamento e o restante volume utilizado noutras tarefas do projeto de investigação.

Previamente aos ensaios de UF, as amostras foram submetidas a um pré-tratamento, como descrito no *subcapítulo 3.2*.

3.2 Procedimentos Experimentais

Neste subcapítulo são apresentados de forma sucinta os procedimentos experimentais a que o efluente de cozedura de cortiça foi submetido: pré-tratamento, ensaios de UF e oxidação química dos concentrados.

3.2.1 Pré-Tratamento

O pré-tratamento do efluente teve como objetivo remover os SS (em cerca de 65%) e minimizar o desgaste das membranas de UF e consequente redução do seu desempenho.

Este pré-tratamento consistiu numa MF convencional, recorrendo a uma bomba peristáltica (ProMinent 340) que forçou a passagem do efluente através de filtros de profundidade com porosidades de 10 e 5 μm (Amazon Filters).

3.2.2 Ultrafiltração

Os ensaios de UF foram realizados numa unidade piloto de filtração (LabUnit M20, Danhish Separation Systems - Silkeborg, Dinamarca), esquematicamente apresentada na figura 3.1, utilizando membranas comerciais de UF (Alfa Laval/DSS Nakskov, Dinamarca). De acordo com o fabricante, estas membranas têm uma camada ativa produzida com um polímero polissulfona patenteado com resistência suficiente para processar soluções até 75°C, numa gama de pH entre 1 e 13 e diferenças de pressão através da membrana até 10 bar. Tem sido descrito que a série de membranas GR apresenta natureza hidrofóbica e as medições de potencial zeta demonstram que estas membranas aumentam a carga negativa quando o pH é superior a 3,5, provavelmente devido à adsorção de iões OH^- ou Cl^- (Nystrom e Jarvinen, 1991; Mulder 1997).

As condições de operação dos ensaios descontínuos de UF concretizados foram estabelecidas em função da seletividade das membranas, membranas com menor CEM apresentam menores fluxos de permeado, e do impacto antecipado para a polarização de concentração e colmatação em função da sequência de fracionamento (figura 3.2). A área superficial efetiva nos ensaios com as membranas GR40PP (CEM de 100 kDa) e GR51PP (CEM de 50 kDa) foi de 0.252 m^2 e de 0.144 m^2 nos ensaios com as membranas GR61PP (CEM de 20 kDa) e GR81PP (CEM de 10 kDa). A força motriz do processo de separação, a diferença de pressão através da membrana (PTM), acompanhou o aumento da seletividade das membranas, tendo sido de 1 bar com a membrana GR40PP, 1.5 bar para a GR51PP, 2 bar com GR61PP e de 3 bar com a membrana GR81PP. Os ensaios foram realizados a temperatura constante ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) e a velocidades de fluxo tangencial de 0,87 m s^{-1} (o valor máximo atingido pela bomba de recirculação, que corresponde ao número de Reynolds de 1070).

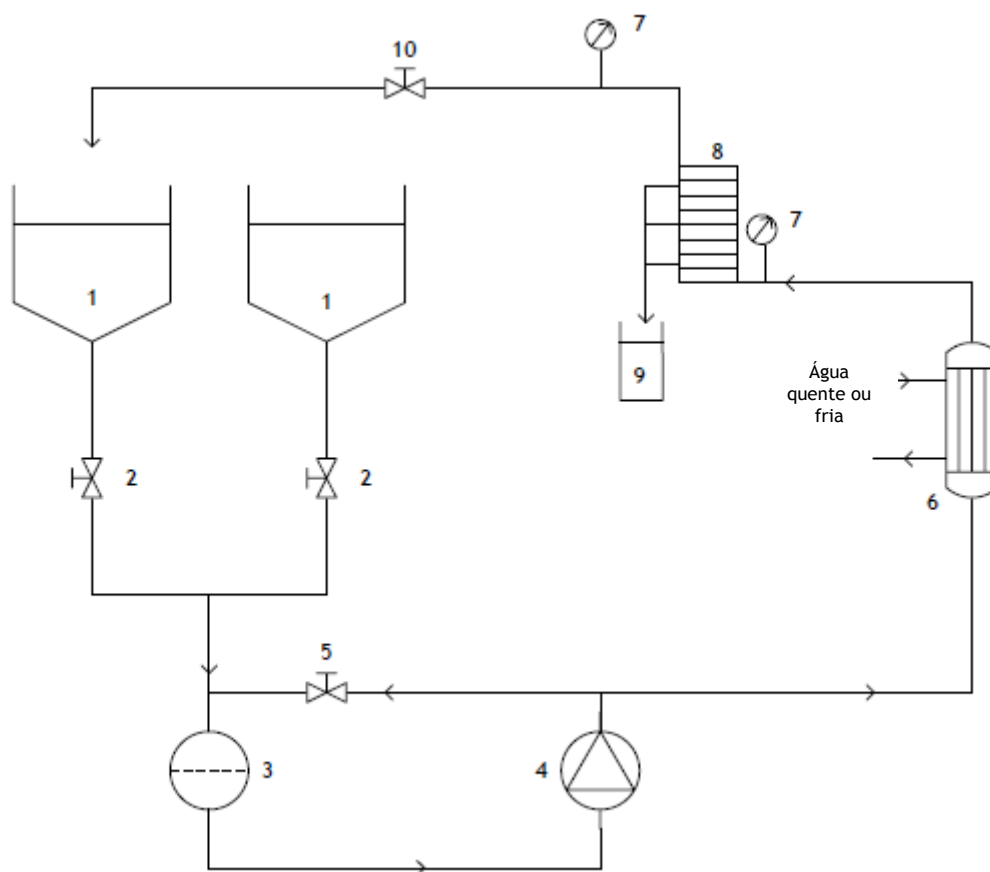


Figura 3.1: Esquema representativo da unidade piloto de filtração utilizada nos ensaios de UF. 1 - Tanque de alimentação (5 a 9 L); 2 - Válvula para selecionar o tanque de alimentação; 3 - Filtro de segurança da bomba; 4 - Bomba de alta pressão; 5 - Válvula para ajuste do fluxo de recirculação; 6 - Permutador de calor; 7 - Manômetro; 8 - Pratos; 9 - Tubos para recolha do permeado; 10 - Válvula para regular a pressão.

Anteriormente à utilização, as membranas foram lavadas, durante a noite, por imersão em água para remover as impurezas restantes do processo de fabrico ou eventuais aditivos aplicados para estabilização; de seguida, as membranas foram pressurizadas a 8 bar durante cerca de 3h, por recirculação de água pura. Este procedimento pretendeu minimizar a influência do efeito de compactação das membranas na operação subsequente. Após este passo, o coeficiente de permeabilidade da água pura ($L_p^{água}$) das membranas foi medido ($L h^{-1} m^{-2} bar^{-1}$) que, em todos os casos, se correlacionou com a PTM em retas com coeficientes de correlação superiores a 0,98. Depois de cada ensaio com efluente de cozimento da cortiça, as membranas foram lavadas cuidadosamente com água pura e uma solução com um agente alcalino (P3 da Ultrasil 11 comercializado pela Henkel-Ecolab) até pelo menos 95% do $L_p^{água}$ ser recuperado.

O procedimento aplicado no fracionamento sequencial é ilustrado na figura 3.2.

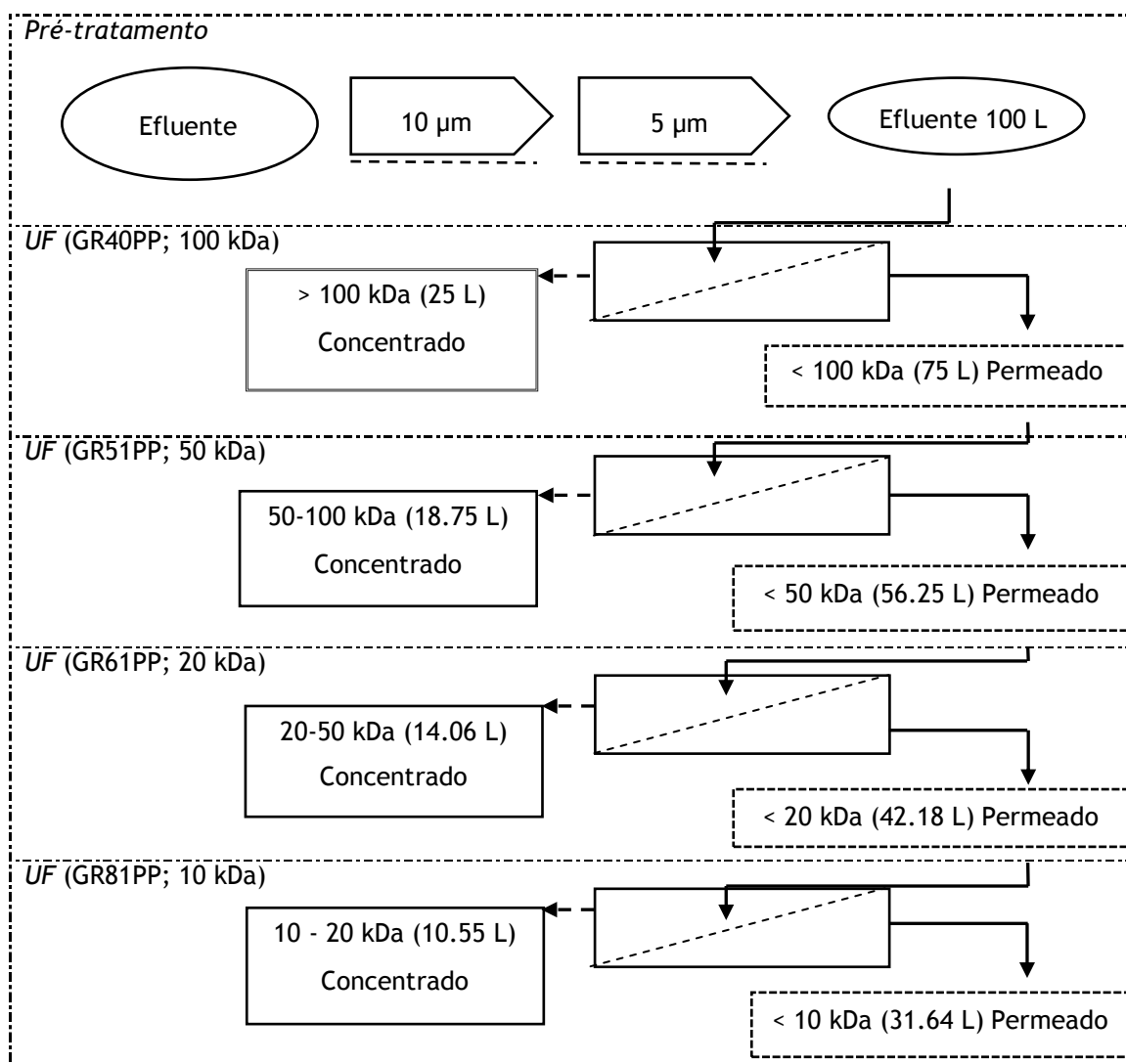


Figura 3.2: Diagrama esquemático do fracionamento sequencial de UF.

Previamente à recolha do permeado, fixaram-se as condições de PTM e temperatura e aguardou-se cerca de 20 minutos para que as mesmas estabilizassem. A recolha do permeado foi efetuada de modo a atingir um fator de redução de volume (FRV) igual a 4 (equação 3.1), que corresponde a uma taxa de recuperação (TR) de 75% (equação 3.2).

O fator de redução de volume foi calculado pela equação 3.1:

$$FRV = \frac{\text{Volume inicial de efluente de cozedura da cortiça}}{\text{Volume de concentrado recolhido}} \quad (\text{equação 3.1})$$

A taxa de recuperação foi determinada pela equação 3.2:

$$TR = \frac{\text{Volume final de permeado recolhido}}{\text{Volume inicial de efluente de cozedura da cortiça}} \times 100 \quad (\text{equação 3.2})$$

A seletividade das membranas foi expressa pelo coeficiente de rejeição, representado pela equação 3.3:

$$f = \frac{\text{Concentração inicial na alimentação} - \text{Concentração no permeado}}{\text{Concentração inicial na alimentação}} \quad (\text{equação 3.3})$$

A primeira etapa de UF iniciou-se com um volume de 100 L de efluente, de forma a garantir volume suficiente para o processo de fracionamento, caracterização e concretização dos ensaios de oxidação. Resumidamente, antes de prosseguirmos para a etapa seguinte, era recolhido 1 L de permeado para análise e 5 L de concentrado eram refrigerados a 4°C para os ensaios de ozonização e análise.

Deste procedimento resultaram 4 frações de concentrados (>100 kDa, 50-100 kDa, 20-50 kDa e 10-20 kDa) e 1 fração de permeado (<10 kDa), que foram submetidas a oxidação química por ozono, como descrito em 3.2.3.

3.2.3 Oxidação química com Ozono

A oxidação química das frações foi realizada com ozono produzido a partir de oxigénio seco e puro num gerador Fischer Model 502 (Bonn, Alemanha). A concentração de ozono na fase gasosa variou entre 23 e 27 mg L⁻¹ e a taxa de fluxo volumétrico foi fixada em 50 L h⁻¹, correspondendo a uma produção média de 20.9 mg O₃ min⁻¹.

A ozonização das frações foi realizada num reator fechado de 500 mL com agitação a 1200 rpm, de modo a promover a transferência do ozono gasoso para a solução. A este reator fechado estava ligado um frasco lavador com 400 mL de água destilada e 8 g de iodeto de potássio (KI) para absorver o ozono que não era fixado pela amostra que estava no reator. Assim, o ozono consumido era calculado através da diferença entre o ozono produzido e o ozono absorvido no frasco lavador. O esquema representativo do gerador de ozono é apresentado na figura 3.3.

Os ensaios de oxidação foram efetuados a 20±1°C e tiveram uma duração entre 2 e 32 minutos, consequentemente a dose de ozono aplicado variou entre 35.8 e 619.2 mg. A oxidação química de cada fração foi realizada a 3 extensões que variaram entre 0.15 e 0.60, aplicando-se a razão O₃ aplicado/CQO_{removido}. A quantidade de ozono aplicada foi intencionalmente limitada, uma vez que este reagente é dispendioso e o rendimento da reação diminui com a duração do ensaio.

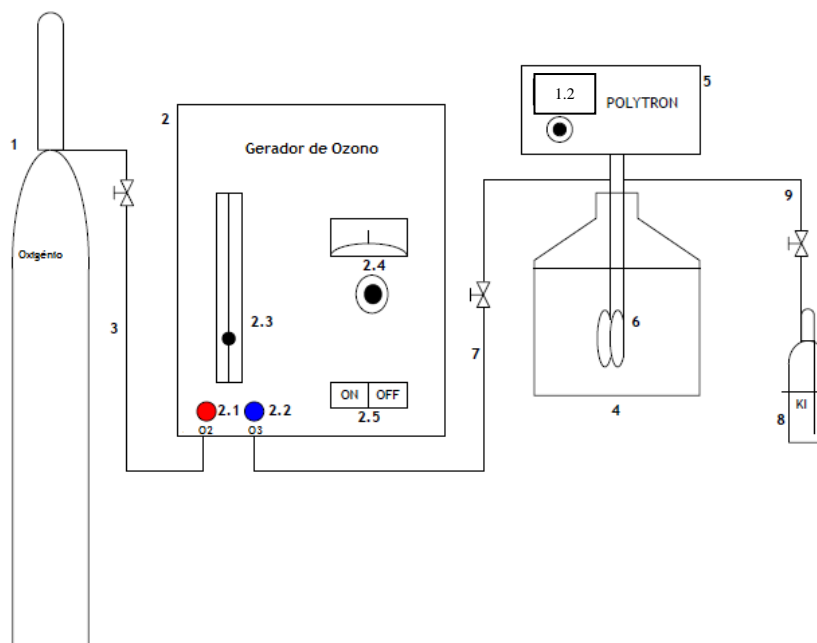


Figura 3.3: Esquema representativo do equipamento utilizado na ozonização, em que: 1 - garrafa de oxigênio puro; 2 - gerador de ozono; 2.1 - entrada de oxigênio; 2.2 - ozono produzido; 2.3 - mostrador com a taxa de fluxo volumétrico (ml min⁻¹); 2.4 - potencial (V); 2.5 - ligar/desligar; 3 - tubo que transporta o oxigênio puro e seco para o gerador de ozono; 4 - reator fechado; 5 - agitação mecânica fixada a 1200 rpm; 6 - agitador e entrada do ozono produzido e saída do ozono não; 7 - tubo que transporta o ozono produzido para o reator fechado; 8 - frasco lavador com 400 mL de água destilada e 8 g de KI; 9 - tubo que transporta o ozono que não foi absorvido no reator para o frasco lavador.

Todas as determinações das concentrações de ozono foram realizadas pelo método iodométrico, como explicado no *subcapítulo* 3.3; onde também se encontram descritas as determinações analíticas realizadas às amostras antes e após as oxidações.

3.3 Determinações analíticas e Equipamentos

Na tabela 3.1 apresentam-se as determinações analíticas utilizadas na caracterização do efluente e das amostras recolhidas nos ensaios de UF e de oxidação.

As medições de pH foram realizadas num medidor modelo GLP 22 com um eletrodo ACC ambos da Crison à temperatura ambiente. O eletrodo foi calibrado, diariamente, com tampões de pH (pH 4.02 e pH 7.00).

As análises de Carência Química de Oxigênio (CQO), Carbono Orgânico Total (COT) e Sólidos Suspensos (SS) foram realizadas de acordo com o Standard Methods (APHA, 1998): método 5220 C, método 5310 B e método 2540 D, respetivamente. As determinações de Carência Bioquímica de Oxigênio (CBO) foram realizadas em sistema OxiTop OC (WTW, Alemanha), de acordo com o método respirométrico (método 5210 D) adaptado de Standard Methods (APHA,

1998). Para a determinação dos SS foram utilizados filtros de microfibras de vidro GF/C, com um diâmetro de 47 mm (Whatman) e a mufla Vulcan 3-550 Ney.

As quantificações de Fenóis Totais (FT) foram efetuadas de acordo com Makkar et al. (1993).

O espectrofotômetro Thermo Scientific de modelo Helios Omega e uma célula de quartzo foram utilizados na medição das absorvências a 254 nm (A254) para determinação dos compostos aromáticos (usando uma diluição de 1:50) e a 580 nm (A580) para quantificação da cor das amostras (usando uma diluição de 1:10). Anteriormente a cada uma destas medições, foi utilizada água destilada para realizar o branco e fixar o zero das leituras.

Tabela 3.1 Descrição das determinações analíticas efetuadas e amostras alvo.

| Determinações analíticas | Efluente de cozimento da cortiça | Ensaio de UF | Ozonização |
|--------------------------|----------------------------------|--------------|------------|
| pH | ✓ | ✓ | ✓ |
| CQO | ✓ | ✓ | ✓ |
| COT | ✓ | ✓ | ✓ |
| SS | ✓ | | |
| A254 | ✓ | ✓ | ✓ |
| A580 | ✓ | ✓ | ✓ |
| CBO ₅ | ✓ | ✓ | ✓ |
| CBO ₂₀ | ✓ | ✓ | ✓ |
| Toxicidade | ✓ | ✓ | ✓ |
| Fenóis Totais | ✓ | ✓ | ✓ |
| HPLC-DAD | ✓ | ✓ | ✓ |
| LC-MS | ✓ | | |
| Ozono solúvel | | | ✓ |

A ecotoxicidade das amostras foi testada com a bactéria luminescente *V. fischeri* de acordo com o protocolo de toxicidade aguda do Microtox® e a identificação e quantificação de vários compostos fenólicos foi realizada recorrendo à cromatografia líquida de alta eficiência.

3.3.1 Carência Química de Oxigénio (CQO)

A determinação da CQO é utilizada para avaliar a qualidade de águas residuais domésticas e industriais, uma vez que permite estimar o oxigénio necessário à oxidação da matéria orgânica presente na amostra e suscetível de oxidação por parte de um oxidante químico forte, dicromato de potássio - $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, em meio ácido (ácido sulfúrico) e na presença de um

catalisador (sulfato de prata). A diferença entre a quantidade inicial e remanescente de oxidante é convertida em oxigénio. O excesso de dicromato foi obtido através de titulação com uma solução de sulfato de amónio ferroso, após padronização, utilizando um titulador automático Metrohm, 665 Dosimat, enquanto a digestão decorreu, durante 120 min a 150°C, num bloco digestor Lovibond ET 125.

3.3.2 Carbono Orgânico Total (COT)

O princípio desta técnica consiste na combustão de moléculas orgânicas e inorgânicas, a alta temperatura, sendo quantificado o CO₂ por meio de um analisador de infravermelhos (APHA, 1998). O valor do COT é determinado pela diferença entre o Carbono Total (CT) e o Carbono Inorgânico Total (CIT).

O COT é a quantidade de carbono ligado a um composto orgânico e é, frequentemente, utilizado como indicador não específico da qualidade da água. Estes compostos podem estar em diferentes estados de oxidação, podendo alguns ser oxidados através de processos químicos ou biológicos (Da Piedade Silva, 2011).

Na determinação do COT foi utilizado o analisador de carbono orgânico total de Shimadzu, TOC-V CSH, e o método aplicado foi o de combustão a alta temperatura.

3.3.3 Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO)

A determinação da CBO é um teste empírico que recorre a procedimentos laboratoriais normalizados que permitem avaliar a concentração de compostos biodegradáveis presentes em águas residuais e poluídas. O teste mede o oxigénio utilizado, durante um período específico de incubação, para a degradação bioquímica da matéria orgânica e para oxidar matéria inorgânica como sulfeto de ferro e ferro ferroso. Este teste também pode medir o oxigénio necessário à oxidação de compostos com azoto, pelo que foi adicionado um inibidor da nitrificação (N-alquiltioreira).

Os ensaios de CBO deste trabalho foram realizados em sistema OxiTop® OC100 (WTW), utilizando sensores de pressão, de acordo com o método respirométrico adaptado do Standard Methods (APHA, 1998) (método 5210 D) seguindo o manual do equipamento (System oxitop Control, 1998). Este método mede direta e continuamente o oxigénio consumido pelos microrganismos a partir do ar ou de um ambiente enriquecido com oxigénio, num recipiente fechado, sob condições de temperatura e agitação constantes. A quantificação utilizando este sistema é baseada na medição de variação de pressão num sistema fechado, visto que os microrganismos consomem o oxigénio e produzem CO₂.

O equipamento utilizado encontra-se ilustrado na figura 3.4 e inclui: frascos com uma capacidade máxima de 310 mL (aos quais é adicionado NaOH para fixar o CO₂ libertado durante o ensaio), sensores de pressão que medem a CBO, placa de agitação e um controlador que permite aceder às medições dos sensores de cada amostra.

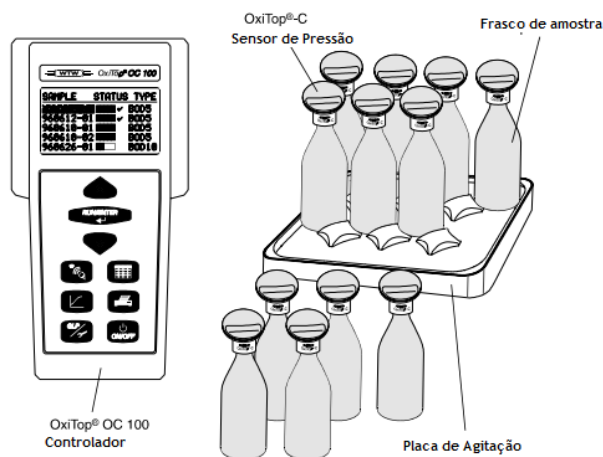


Figura 3.4: Equipamento utilizado nas determinações de CBO: Sistema OxiTop (adaptado de System OxiTop Control, 1998).

Todos os ensaios foram realizados, em duplicado. Em paralelo, foram realizados ensaios com água destilada (branco) e com solução padrão de glucose-ácido glutâmico.

Com base em outros estudos de biodegradabilidade aeróbia realizados no âmbito deste projeto de investigação, verificou-se que os valores de CBO após 5 dias correspondiam a uma fração reduzida da matéria orgânica acessível ao metabolismo dos microorganismos sem que fossem obtidos valores constantes, tal como pretendido. No âmbito do projeto de investigação concluiu-se que através do aumento do tempo de incubação para 20 dias é possível obter valores de CBO constantes para todas amostras.

Assim, neste trabalho experimental, foram considerados dois Índices de Biodegradabilidade, que correspondem às razões entre CBO₅/CQO e CBO₂₀/CQO.

Todo o procedimento experimental pode ser consultado no Anexo 1.

3.3.4 Toxicidade

A ecotoxicidade do efluente da água de cozedura da cortiça e das frações que resultaram da UF foi avaliada através da inibição de luminescência da bactéria *V. fischeri*. Os ensaios foram realizados com diluições (em % v/v) das amostras filtradas (filtros de porosidade 0.45 µm)

num analisador Microtox Model 500 de acordo com o procedimento padrão (Azur Environment, 2002) que inclui ajuste osmótico com uma solução de NaCl 2% e pH próximo de 7.

O equipamento utilizado encontra-se ilustrado na figura 3.5:



Figura 3.5: Equipamento utilizado na avaliação da ecotoxicidade (adaptado de Azur Environment, 2002).

Os valores de toxicidade foram calculados a partir das medições de EC_{50} (diluição da amostra que causa uma redução de 50% da luminescência da bactéria, após 5 e 15 minutos de exposição), as quais foram calculadas de acordo com o método *gamma*, usando uma regressão linear da diluição das amostras como logaritmo natural *versus* percentagem de inibição. Todos os coeficientes de correlação foram acima de 0.90, caso contrário as determinações eram repetidas.

Devido à coloração das amostras, foi necessário realizar uma correção do efeito da cor, o qual envolve a realização de leituras de absorvências das amostras (às diluições utilizadas nos ensaios) a 490 nm, sendo o valor de EC_{50} recalculado pelo programa.

Os resultados de toxicidade aguda para 5 e 15 minutos foram expressos em unidades de toxicidade (UT), de acordo com $100/EC_{50}$.

3.3.5 Fenóis Totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais presentes nas amostras em estudo foi realizada através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Makkar (1993)).

O método baseia-se na redução dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico, presentes no reagente de Folin-Ciocalteu pelos compostos fenólicos presentes na amostra, produzindo um complexo de coloração azul que absorve a 765 nm. A reação ocorre em meio alcalino que se obtém por adição de uma solução de carbonato de sódio (2 M) (Da Piedade Silva, 2011). O

procedimento experimental seguido para a determinação dos fenóis totais encontra-se no descrito no Anexo 1.

3.3.6 HPLC-DAD

A concentração de vários poluentes nas amostras, nomeadamente do ácido gálico, siríngico, protocatecuico, elágico e tânico e do aldeído vanílico e protocatecuico, foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* - HPLC), que é uma técnica analítica de separação e quantificação de compostos químicos. O equipamento de HPLC utilizado (Merck-Hitachi Elite Lachrom) é composto por bomba de alta pressão (Merck-Hitachi Pump L 2130), forno (Merck-Hitachi Column Oven L-2300) e detetor de *diode array* (DAD) (Merck-Hitachi Diode Array Detector L-2455). O seu princípio de funcionamento assenta na diferença de afinidades dos compostos injetados no sistema com as duas fases imiscíveis - a fase móvel (eluente) e a fase estacionária (enchimento da coluna).

Nas análises cromatográficas efetuadas injetaram-se, à temperatura ambiente, 20 µL das soluções em estudo (compostos padrão e amostras, após filtração), numa coluna C-18 de fase reversa (Merck), de 250 x 4 mm, com um diâmetro de partículas de 5 µm. A eluição foi efetuada com um sistema binário de solventes (solvente A (H₂O-CH₃COOH (999:1 v/v)) e B (CH₃OH-CH₃COOH (999:1))), utilizando um fluxo de fase móvel de 1 mL/min. A composição da fase móvel foi variável tendo sido programada através do seguinte gradiente: A:B (90:10) até 5 minutos; alteração do gradiente para A:B (50:50) durante 30 minutos, o qual se manteve por 8 minutos; alteração do gradiente para A:B (90:10) durante 1 minuto, que se manteve ao longo de 16 minutos.

Entre cada ensaio cromatográfico, a coluna foi lavada com 100% de B e estabilizada com as condições iniciais do ensaio, durante 10 minutos.

A deteção dos compostos foi realizada por DAD em UV-visível entre 220 e 600 nm. As identificações dos compostos em estudo foram efetuadas por comparação do tempo de retenção e do espectro de absorvência de cada pico cromatográfico com padrões.

3.3.7 LC-MS

A cromatografia líquida de alto desempenho acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) é uma técnica extremamente versátil e apropriada para a análise de amostras com composição muito complexa, tal como as analisadas.

A identificação de vários compostos presentes na amostra da água residual do efluente da cortiça foi realizada utilizando o equipamento Finnigan Surveyor (San Jose, EUA) composto

por um detetor de *diode array* (Acella PDA), um detetor de massa (Finnigan LCQ Fleet) e uma bomba de alta pressão (Accela 600).

Nas análises cromatográficas efetuadas injetaram-se, à temperatura ambiente, 10 µL da amostra após filtração, numa coluna C-18 de fase reversa, de 150 x 4.6 mm, com um diâmetro de partículas de 5 µm. A eluição foi efetuada com um sistema binário de solventes (solvente A (H₂O-CH₃COOH (999:1 v/v)) e B (CH₃OH-CH₃COOH (999:1))), utilizando um fluxo de fase móvel de 0.3 mL/min. A composição da fase móvel foi variável, tendo sido utilizado o mesmo programa do HPLC-DAD. O detetor de massa operou com uma voltagem de capilar de 4 kV e a temperatura foi fixada a 325 °C. O espectro foi registado no modo de iões negativos entre *m/z* 120 e 2 000.

Entre cada ensaio cromatográfico, a coluna foi lavada com 100% de B e estabilizada com as condições iniciais do ensaio, durante 10 minutos.

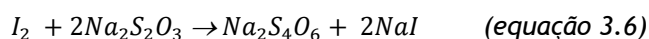
A identificação dos compostos foi realizada por DAD em UV-visível entre 220 e 600 nm e por espetrometria de massa através do padrão de fragmentação [M-H]⁻ em unidades de massa.

3.3.8 Determinação do Ozono Solúvel

Ao longo do procedimento experimental de ozonização das frações de UF, foi necessário determinar a concentração de ozono solúvel para quantificação do ozono produzido, consumido e fixado pela solução aquosa de iodeto de potássio (KI) do frasco lavador (que corresponde ao ozono que não foi consumido). Para esta determinação foi utilizado o método iodométrico, no qual o ozono é absorvido por uma solução neutra ou alcalina de KI e, de seguida, acidificada com ácido acético; o iodo livre é titulado, por titulação potenciométrica, com tiosulfato de sódio, determinando-se a concentração de ozono dissolvido (equação 3.4).

$$C = \frac{(normalidade\ de\ tiosulfato) \times (volume\ de\ tiosulfato) \times 24}{volume\ corrigido\ (L)} \quad (equação\ 3.4)$$

O fator 24 presente na equação anterior resulta da relação entre as equações 3.5 e 3.6, em que uma mole de tiosulfato corresponde a $\frac{1}{2}$ mole de ozono e, portanto, 1 mL de solução de tiosulfato corresponde a 24 mg de ozono (Alsheyab e Muñoz, 2007).



3.4 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e adquiridos à Merck (Alemanhã), à Fulka (Suíça) ou à Sigma-Aldrich (Suíça), exceto o reagente Ultrasil 11 (Henkel-Ecolab, Alemanha) e as soluções utilizadas nos ensaios de ecotoxicidade (Azur Environment, Reino Unido). Os reagentes e solventes utilizados no HPLC eram de grau analítico de HPLC e foram adquiridos à Sigma-Aldrich (Suíça). A água utilizada era desionizada através de um sistema de interface (Millipore) e apresentava condutividade inferior a $1\mu\text{S cm}^{-1}$.

3.5 Recolha e conservação de biomassa

A biomassa aeróbia utilizada foi recolhida a partir de um reator aeróbio do sistema de lamas ativadas utilizado para o tratamento de águas residuais domésticas; portanto sem qualquer contacto com poluentes específicos do efluente do cozimento da cortiça. O inóculo foi mantido em descontinuo no laboratório, durante 6 meses, à temperatura ambiente. O sobrenadante era quinzenalmente substituído por meio de cultura fresco composto por uma mistura de glucose e acetato (com um CQO de $2\,000\text{ mg L}^{-1}$) como fonte de carbono, micro e macro-nutrientes (Anexo 2). O pH era controlado semanalmente e, se necessário, ajustado ao intervalo de 6.5 a 7.5. Este procedimento permitiu o crescimento, adaptação e conservação da biomassa.

Previamente aos ensaios de CBO, a biomassa utilizada como inóculo era sujeita a uma preparação que se encontra descrita no Anexo 1.

4. Resultados experimentais: tratamento e discussão

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos nas diversas vertentes da investigação concretizada para melhorar o desempenho e a sustentabilidade ambiental da indústria corticeira. No *subcapítulo 4.1* descrevem-se os resultados relativos à caracterização do efluente do cozimento da cortiça; o *subcapítulo 4.2* refere-se aos resultados do fracionamento dos poluentes por UF e o subcapítulo 4.3 aos resultados da oxidação química com ozono. Por fim, o subcapítulo 4.4 reporta-se à progressão do perfil fenólico das frações antes e após a ozonização.

4.1 Caracterização do efluente do cozimento da cortiça

Na tabela 4.1, encontram-se apresentados os resultados experimentais obtidos, sendo as características mais relevantes a coloração intensa, a reduzida biodegradabilidade e a elevada toxicidade.

Tabela 4.1 Resultados da caracterização do efluente do cozimento da cortiça.

| Parâmetros | Unidades | Efluente do Cozimento da Cortiça |
|------------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| pH | - | 5,42 |
| CQO | (mg O ₂ L ⁻¹) | 1 536 |
| COT | (mg C L ⁻¹) | 595 |
| CBO ₅ | (mg O ₂ L ⁻¹) | 407 |
| CBO ₂₀ | (mg O ₂ L ⁻¹) | 554 |
| CBO ₅ /CQO | - | 0.26 |
| CBO ₂₀ /CQO | - | 0.36 |
| A254 ⁽¹⁾ | - | 0.395 |
| A580 ⁽²⁾ | - | 0.118 |
| Toxicidade | UT | 3.08 ⁽³⁾ |
| | | 3.46 ⁽⁴⁾ |
| Fenóis Totais ⁽⁵⁾ | (mg L ⁻¹) | 110.3 |

⁽¹⁾ Absorvência a 254 nm, diluição 1:50 ⁽²⁾ Absorvência 580 nm, diluição 1:5 ⁽³⁾ 50% de inibição, durante uma exposição de 5 minutos ⁽⁴⁾ 50% de inibição, durante uma exposição de 15 minutos ⁽⁵⁾ Fenóis totais expressos em concentração de ácido tânico

A comparação entre estes resultados e os anteriormente publicados (tabela 2.2) indica que estão incluídos nos intervalos de variação estabelecidos através da revisão bibliográfica

realizada, exceto relativamente à concentração de matéria orgânica, expressa através da CQO e dos FT.

O pH da amostra reflete que o efluente do cozimento da cortiça, utilizado neste trabalho, é moderadamente ácido. Contudo, este resultado não limita a depuração do efluente através de processos físico-químicos ou biológicos, uma vez que o mesmo pode ser facilmente ajustado. Relativamente à CQO, o resultado obtido ultrapassa significativamente o valor imposto pela legislação para a descarga de águas residuais em meios recetores naturais, 150 mg L⁻¹, apesar de corresponder a uma carga orgânica inferior à maioria dos resultados publicados, os quais revelam uma variação entre 1 500 e 5 500 mg O₂ L⁻¹ (Dias-Machado, 2005). Porém, a variação de carga orgânica pode ser explicada pela diferença entre a composição da cortiça que é processada, devido a fatores geográficos e climáticos, à composição do solo e às dimensões e idade do sobreiro (Pereira, 2007). A par destes fatores, reflete ainda um consumo específico de água elevado para satisfazer rigorosos padrões de qualidade dos produtos, aspeto que limita o número de ciclos de reutilização da água na operação de cozimento. Acresce que a recolha do efluente foi concretizada à saída de um tanque de homogeneização e equalização que precede um pré-tratamento de coagulação/floculação na unidade industrial, onde efetuámos a recolha. É importante destacar que a contaminação das rolhas de cortiça por compostos orgânicos, nomeadamente por TCA, é exaustivamente controlada pela indústria através de metodologias analíticas com limites de deteção entre 1 e 2 ng g⁻¹ de cortiça e que determinam a possibilidade da cortiça ser utilizada na produção de rolhas (Insa et al., 2006).

Todavia, o principal problema ambiental do efluente do cozimento da cortiça resulta do seu carácter biorecalcitrante traduzido por uma significativa diferença entre a CQO (1 536 mg O₂ L⁻¹) e os valores obtidos de CBO após 5 e 20 dias de incubação 407 e 554 mg O₂ L⁻¹, respetivamente. Consequentemente, os valores para os índices de biodegradabilidade utilizados, CBO₅/CQO e CBO₂₀/CQO, foram 0.26 e 0.36, respetivamente, e revelam que uma fração importante dos poluentes não é acessível à oxidação biológica. Alguns autores recomendam que o âmbito de aplicação de tratamento biológico aeróbio e anaeróbio requer valores da razão CBO₅/CQO superiores a 0.30 ou 0.40, respetivamente (Metcalf e Eddy, 1991).

Para efluentes complexos, como o caso do efluente do cozimento da cortiça, constituídos por compostos orgânicos que integram um grande intervalo de tamanhos moleculares, deve considerar-se a CBO₅ como a fração rápida e facilmente biodegradável de toda a matéria orgânica disponível, a qual no nosso estudo correspondeu somente a 26% do teor total. No entanto, aumentando o tempo de incubação de 5 para 20 dias, a CBO determinada aumentou 36%, o que significa que, após 5 dias, apenas 73% dos orgânicos biodegradáveis são metabolizados.

Consultando a tabela 2.2, verifica-se que os resultados de biodegradabilidade obtidos se enquadram nos descritos pela literatura. O inóculo utilizado não foi sujeito a qualquer processo de adaptação às características e composição específica da água residual, contendo o espectro de microrganismos que sustentam o funcionamento dos bioreactores na depuração de efluente doméstico, cuja razão CBO_5/CQO varia entre 0.42 e 0.59 (Metcalf e Eddy, 1991).

A absorvência a 254 nm (A_{254}) foi medida, numa diluição de 1:50, e reflete a concentração de compostos aromáticos presentes na amostra. O resultado obtido (0.395) foi superior ao descrito na literatura (0.218) para as mesmas condições experimentais (Benítez et al. 2008 b, Benítez et al. 2009); ou seja, pode afirmar-se que o efluente estudado apresenta um teor de compostos aromáticos superior ao da bibliografia.

A coloração da amostra foi estudada através da medição da absorvência a 580 nm (A_{580}), numa diluição de 1:5. Esta determinação foi adaptada do estudo realizado por Benítez (2008 (b)) com efluentes do cozimento da cortiça de indústrias espanholas, onde as amostras analisadas apresentaram colorações com $A_{580}=0.114$, para uma diluição de 1:10. Assim, pode verificar-se que o efluente analisado neste trabalho apresenta uma coloração menos intensa (0.118, diluição 1:5) que a descrita na literatura.

A toxicidade do efluente corresponde à diluição necessária para obter 50% da inibição da luminescência da bactéria marinha *Vibrio fischeri*, ao fim de 5 e 15 minutos de exposição (3.08 e 3.46 UT, respetivamente), e, segundo Bennett e Cuttage (1992), pode ser descrita como leve ou moderada, uma vez que se encontra entre 1 e 5 UT.

A concentração de FT presentes no efluente foi determinada, visto que é a principal classe poluente, e expressa em concentração de ácido tânico. Apesar da reduzida biodegradabilidade deste efluente, o resultado obtido (110.3 mg ácido tânico L^{-1}) é inferior aos valores médios descritos na literatura (600 a 900 mg ácido tânico L^{-1}), mas encontra-se em linha com a CQO obtida.

A classe dos fenóis inclui os taninos hidrolisáveis (complexos que derivam do ácido gálico e do ácido elágico) e os taninos condensados (proantocianidinas) (Cadahía et al., 1998). De forma a obter-se uma caracterização mais rigorosa, o perfil fenólico do efluente do cozimento da cortiça foi analisado por cromatografia líquida, como descrito nos *subcapítulos 3.3.6 e 3.3.7*. Esta análise permitiu confirmar a composição complexa desta água residual, através da análise do cromatograma (figura 4.1) que indica a presença de cerca de 50 compostos orgânicos, dos quais 20 compostos fenólicos foram identificados (tabela 4.2) através da comparação entre os espectros na região do UV-visível (220-600 nm), no caso dos compostos estarem disponíveis, ou por espectrometria de massa nos restantes casos.

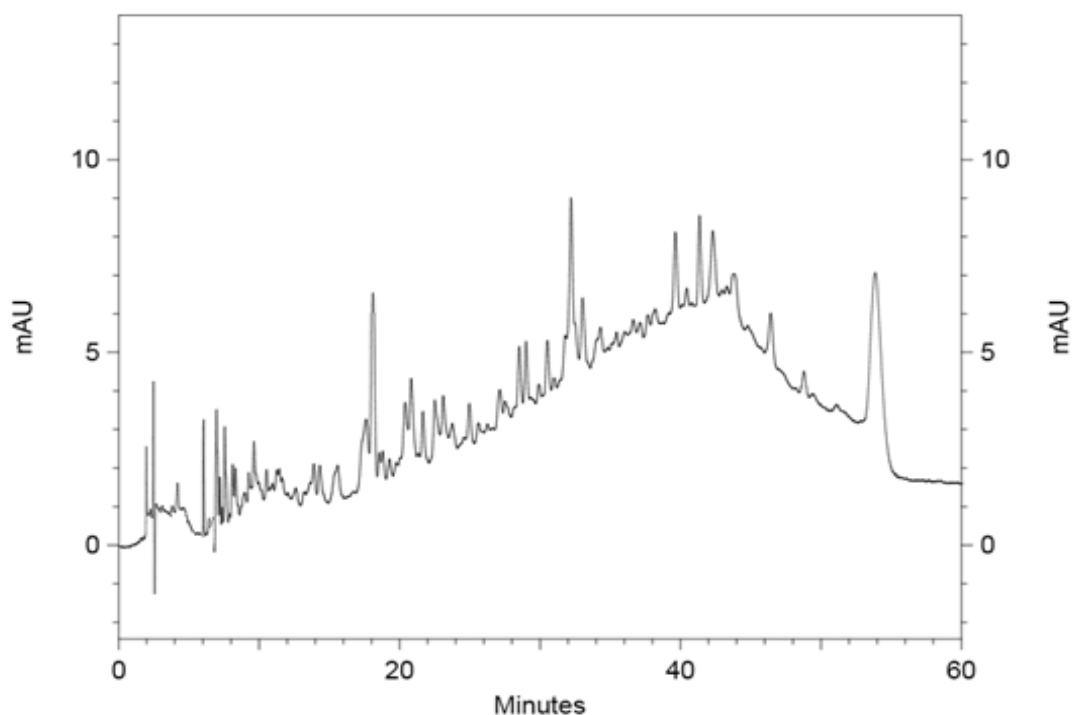


Figura 4.1 Cromatograma do efluente do cozimento da cortiça por HPLC-DAD, considerando as absorvências na região do UV-visível (220-600 nm) (condições analíticas indicadas no subcapítulo 3.3.6)

Através de retas de calibração construídas com soluções padrão (Anexo 3), procedeu-se à quantificação de alguns dos compostos fenólicos identificados, os quais foram selecionados de entre os previamente quantificados na literatura para o efluente do cozimento da cortiça ou em amostras de cortiça (Fernandes et al., 2011; Minhalma e de Pinho, 2001).

Os resultados das quantificações encontram-se apresentados na tabela 4.2 e são consequência da água quente ser um excelente solvente para a extração de compostos não ligados ou fracamente ligados às células da cortiça (Fernandes et al., 2011).

Os resultados para a concentração dos compostos específicos quantificados variam entre 0.22 e 7.60 mg L⁻¹ para os ácidos elágico e tânico, respetivamente, ou seja, inferiores aos valores anteriormente publicados por Minhalma e de Pinho (2001), os quais se situam entre 2 mg L⁻¹ para o ácido gálico e 35 mg L⁻¹ para o ácido elágico. Apesar de se dispor de soluções padrão dos ácidos vanílico e ferúlico a sua presença na amostra analisada não foi confirmada e, consequente, também não foi possível concretizar a respetiva quantificação. Porém, relativamente aos resultados publicados acrescentámos a quantificação do aldeído protocatecuico e do ácido tânico, os quais estão presentes na cortiça (Fernandes et al., 2011).

Tabela 4.2 Identificação e quantificação de alguns compostos fenólicos presentes no efluente do cozimento da cortiça (condições analíticas indicadas nos *subcapítulos* 3.3.6 e 3.3.7).

| Composto | Tempo de Retenção (min) | λ_{max} (nm) | $[M-H]^-$ m/z | Concentração (mg L ⁻¹) |
|--------------------------------|-------------------------|-----------------------------|---------------|------------------------------------|
| Ácido Gálico | 11.05 | 271 | 169 | 2.46 |
| Ácido Protocatecuico | 18.32 | 259;293 | 153 | 0.38 |
| Ácido Hidroxifenilático | 19.64 | | 197 | - |
| Aldeído Protocatecuico | 23.82 | 280;310 | 137 | 0.56 |
| Coniferaldeído | 23.84 | 289; 340 | 177 | - |
| Esculetina | 26.22 | | 177 | - |
| Ácido Cafeico | 27.67 | 324 | 179 | - |
| Ácido Siringico | 28.60 | 275 | 197 | 0.22 |
| Desoxi-hexose do ácido elágico | 28.80 | 253; 373 | 447 | - |
| Aldeído Vanílico | 28.84 | 280;310 | 151 | 0.60 |
| Ácido Ferúlico | 34.68 | 323 | 193 | - |
| Eriodictiol | 35.53 | | | - |
| Naringenina | 37.85 | | | - |
| Hexose do ácido elágico | 38.03 | 253; 373 | 463 | - |
| Pentose do ácido elágico | 39.62 | 253; 373 | 433 | - |
| Di-hexa-hidroxidifenil glucose | 44.97 | 271 | 783 | - |
| Ácido Elágico | 45.99 | 254;373 | 301 | 2.92 |
| Vescalagina/Castalagina | 47.27 | 247 | 933 | - |
| Delfinidina | 48.23 | | | - |
| Ácido Tânico | 53.94 | 380 | 1699 | 7.60 |

Os resultados da caracterização do efluente, nomeadamente a composição complexa, reduzida biodegradabilidade e elevada toxicidade, constituem constrangimentos à implementação de tecnologias de depuração baseadas em processos biológicos. Assim, através do fracionamento dos poluentes por membranas de UF podemos estabelecer a distribuição da carga orgânica, FT e cor em função da dimensão, proceder à caracterização das frações antes e após oxidação química; contribuindo para a implementação na indústria corticeira de sistemas integrados de tratamento que incluam a UF, ozonização e tratamento biológico. O fracionamento dos poluentes concretizado sequencialmente através de membranas de UF com seletividade crescente encontra-se descrito no *subcapítulo* 4.2.

4.2 Fracionamento por UF

Tal como foi apresentado no subcapítulo anterior, a caracterização da água residual produzida na operação de cozimento da cortiça revelou uma carga orgânica elevada e uma composição complexa. Neste contexto, o recurso a uma sequência de filtrações com membranas de UF com seletividade crescente, CEM entre 100 e 10 kDa, permite obter informação sobre a distribuição da carga orgânica em função da dimensão molecular das frações produzidas, nomeadamente estabelecer a contribuição destas para a CQO, FT e cor do efluente.

O procedimento experimental envolvido no ensaio com a unidade de filtração piloto encontra-se descrito no *subcapítulo 3.2.2*. O fracionamento sequencial foi realizado de acordo com a figura 3.3 e todas as determinações analíticas realizadas às amostras foram apresentados no *subcapítulo 3.3*.

As condições de operação durante os ensaios de recirculação (em contínuo) realizados para determinação da $L_p^{\text{água}}$ e (em descontínuo) com o efluente são apresentadas na tabela 4.3, a qual reúne também as principais características das membranas utilizadas, relativamente à seletividade e produtividade, respetivamente, valores de coeficiente de exclusão molecular fornecidos pelo fabricante e permeabilidade hidráulica determinada experimentalmente. A temperatura durante os ensaios de ultrafiltração foi monitorizada e mantida constante a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ através da circulação de água quente ou fria num permutador de calor consoante as necessidades. Da análise da tabela resulta que os valores de $L_p^{\text{água}}$ refletem o incremento da seletividade das membranas, tal como antecipado.

Tabela 4.3 Condições Operacionais e coeficientes de permeabilidade da água das membranas de UF utilizadas no fracionamento do efluente do cozimento da cortiça.

| Membrana | CEM (kDa) | $L_p^{\text{água}}$ ($\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1} \text{bar}^{-1}$) | Área da membrana (m^2) | PTM (bar) |
|----------|--------------|--|---|--------------|
| GR40PP | 100 | 60.0 | 0.252 | 1.0 |
| GR51PP | 50 | 52.5 | 0.252 | 1.5 |
| GR61PP | 20 | 26.6 | 0.144 | 2.0 |
| GR81PP | 10 | 13.5 | 0.144 | 3.0 |

Durante os ensaios com o efluente, ou com os permeados sequencialmente gerados, a produtividade das membranas foi avaliada através da determinação da permeabilidade L_p ($\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1} \text{bar}^{-1}$), com o tempo decorrido até se atingir um FRV igual a 4, e os valores obtidos são comparados na figura 4.2.

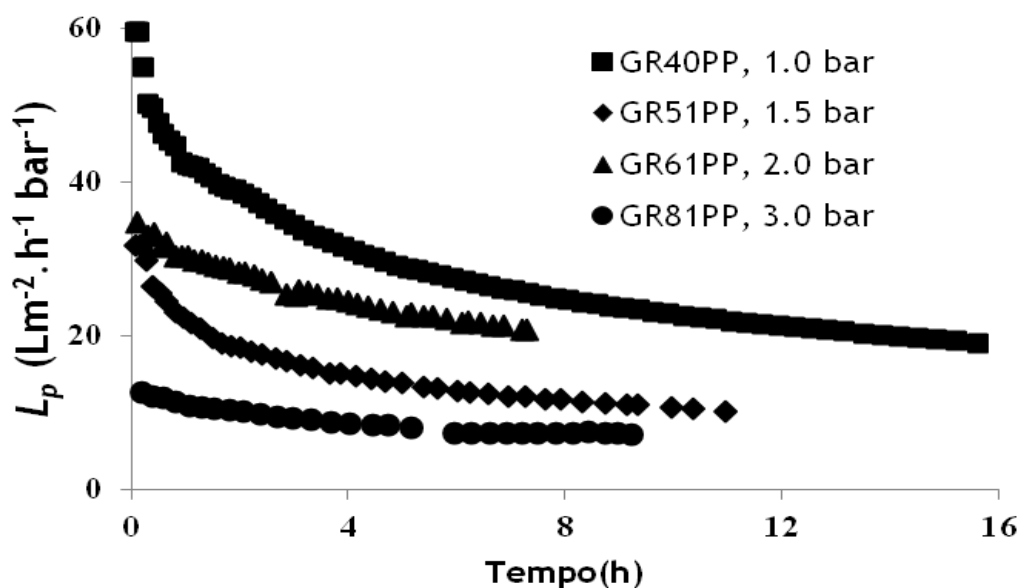


Figura 4.2 Variação do fluxo de permeado normalizado, ao longo do tempo (h) necessário para atingir um FRV igual a 4.

A permeabilidade inicial das membranas variou entre 12.62 e 59.20 $\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1} \text{bar}^{-1}$, e o tempo de operação situou-se entre 7.30 e 15.62 horas, valores que estão de acordo com a evolução da seletividade das membranas para a sequência utilizada, redução da carga orgânica de 1 536 para 520 mg L⁻¹ de CQO e do volume de alimentação de 100 até 42.18 L, exceto no caso do ensaio com a membrana GR61PP. Também os maiores valores de redução da permeabilidade, cerca de 68%, registaram-se nos ensaios com as membranas com menor seletividade, ou seja de 100 kDa e 50 kDa. Porém, é importante salientar que as condições deste estudo são diversas das geralmente observadas quando o desempenho de várias membranas é comparado utilizando a mesma alimentação; na presente investigação só a membrana GR40PP processou diretamente o efluente do cozimento da cortiça e as restantes os permeados obtidos sequencialmente, tal como apresentado no diagrama da figura 3.3. Assim, a partir da membrana com 50 kDa o espectro de variação das características e a dimensão molecular dos compostos foi sendo sucessivamente reduzida através da produção das frações.

Neste contexto específico, as consequências no desempenho das membranas resultantes da inevitável acumulação dos solutos rejeitados na vizinhança da membrana, fenómeno designado como polarização de concentração, são também determinadas pela concentração e características dos solutos acumulados, incluindo a respetiva dimensão molecular, e portanto distintas das que podem ocorrer nas operações individuais com efluente. Acredita-se que a redução do espectro de variação dos solutos rejeitados terá contribuído para facilitar o desenvolvimento de interações entre si e destes com a membrana tendo resultado no desenvolvimento de resistências à filtração que não tinham sido inicialmente antecipadas tendo em consideração exclusivamente a seletividade das membranas e a redução da

concentração de compostos orgânicos para a sequência de fracionamento (Mulder, 1997). No sentido de conservar inalteradas as interações suscetíveis de serem estabelecidas entre os solutos e o material da membrana, nomeadamente baseadas em diferenças de carga elétrica e por adsorção, selecionaram-se membranas produzidas com o mesmo polímero e pelo mesmo fabricante, as quais se distinguem essencialmente pela diferença no CEM.

Na tabela 4.4 apresentam-se os valores dos coeficientes de rejeição (f) calculados para a CQO, FT e cor (A580). A análise dos resultados experimentais apresentados releva também uma variação dos coeficientes de rejeição que não pode ser relacionada com a progressão da seletividade das membranas; contudo deve ser novamente sublinhado o facto de o fracionamento ter sido realizado de forma sequencial, ou seja, o permeado produzido pela membrana GR40PP (CEM 100 kDa) correspondeu à alimentação processada pela membrana com o CEM de 50 kDa (GR51PP) e assim sucessivamente até à membrana mais seletiva ter sido usada. Por esta razão, o sucessivo desempenho das membranas depende fortemente do volume e das características do permeado que resultou da etapa precedente.

Tabela 4.4 Variação da rejeição das membranas para a sequência de fracionamento concretizada através de membranas de UF (FRV igual a 4) (A: Alimentação; P: Permeado; C: Concentrado).

| Membrana (CEM) | Amostra | CQO | | Fenóis totais | | Cor | |
|---------------------|---------|-----------------------|------|-----------------------|------|------------|------|
| | | (mg L ⁻¹) | f | (mg L ⁻¹) | f | (A580nm) | f |
| GR40PP (100 kDa) | A | 1 536 | 0.45 | 110.3 | 0.37 | 0.118 | 0.64 |
| | P | 851 | | 69.4 | | 0.042 | |
| | C | 3 436 | | 233.0 | | 0.342 | |
| GR51PP (50 kDa) | A | 851 | 0.19 | 69.4 | 0.48 | 0.042 | 0.24 |
| | P | 686 | | 36.1 | | 0.032 | |
| | C | 1 348 | | 166.4 | | 0.072 | |
| GR61PP (20 kDa) | A | 686 | 0.24 | 36.1 | 0.20 | 0.032 | 0.50 |
| | P | 520 | | 28.8 | | 0.016 | |
| | C | 1 175 | | 61.8 | | 0.082 | |
| GR81PP (10 kDa) | A | 520 | 0.26 | 28.8 | 0.42 | 0.016 | 0.13 |
| | P | 386 | | 16.6 | | 0.014 | |
| | C | 1 078 | | 55.7 | | 0.020 | |

Apesar da variação das condições operacionais, dos valores de L_p e f na sequência, foi possível estabelecer uma correlação linear entre o CEM das membranas e os valores de CQO, FT e cor dos permeados, apresentando regressões lineares com coeficientes de correlação superiores a 0.95 (ver Anexo 4). Este resultado é muito relevante pois permite antecipar a remoção potencial que pode ser obtida por membranas com CEM entre 10 e 100 kDa para operações

em descontínuo com um FRV igual a 4, ou seja, com recuperação de 75% do volume inicial de efluente.

A análise da CQO dos permeados revela que os compostos retidos pela membrana GR40PP, ou seja, com dimensão molecular superior a 100 kDa, correspondem ao valor mais elevado de *f* para este parâmetro. Todavia, os resultados obtidos para os FT revelam que a remoção obtida pela membrana GR51PP é mais efetiva que a GR40PP, isto é, não existe uma relação entre a CQO e o teor de FT baseada na dimensão molecular. Quanto aos compostos responsáveis pela coloração do efluente, estes são eficazmente eliminados pelas membranas GR40PP e GR61PP, correspondendo aos poluentes de tamanho molecular acima de 100 e 20 kDa, respetivamente.

O volume e as características das cinco frações obtidas no fracionamento sequencial por UF encontram-se apresentados na tabela 4.5 e foram utilizados para calcular os perfis de distribuição de CQO, FT e cor do efluente do cozimento da cortiça através de um balanço mássico tendo em conta o FRV e os volumes sucessivamente ultrafiltrados.

Tabela 4.5 Volume e características do efluente do cozimento da cortiça e das frações obtidas, após fracionamento sequencial por UF.

| Parâmetros | Unidades | Amostra/Fração | | | | | |
|-------------------------------------|--------------------------------------|----------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| | | CBW | 1 > 100 kDa | 2 50-100 kDa | 3 20-50 kDa | 4 10-20 kDa | 5 < 10 kDa |
| | | 100 L | 25 L | 18.75 L | 14.06 L | 10.55 L | 31.62 L |
| pH | - | 5.42 | 6.18 | 6.55 | 6.61 | 6.45 | 6.86 |
| A254 ⁽¹⁾ | - | 0.395 | 1.076 | 0.302 | 0.285 | 0.172 | 0.060 |
| A580 ⁽²⁾ | - | 0.118 | 0.342 | 0.072 | 0.082 | 0.020 | 0.014 |
| CQO | (mg O ₂ L ⁻¹) | 1 536 | 3 436 | 1 348 | 1 175 | 1 078 | 386 |
| COT | (mg C L ⁻¹) | 595 | 1 491 | 572 | 484 | 408 | 166 |
| CBO ₅ | (mg O ₂ L ⁻¹) | 407 | 419 | 263 | 378 | 390 | 308 |
| CBO ₂₀ | (mg O ₂ L ⁻¹) | 554 | 867 | 440 | 524 | 507 | 359 |
| CBO ₅ /CQO | - | 0.26 | 0.12 | 0.20 | 0.32 | 0.36 | 0.80 |
| CBO ₂₀ /CQO | - | 0.36 | 0.25 | 0.33 | 0.45 | 0.47 | 0.93 |
| CBO ₅ /CBO ₂₀ | - | 0.73 | 0.48 | 0.60 | 0.72 | 0.77 | 0.86 |
| FT ⁽³⁾ | (mg L ⁻¹) | 110.3 | 233.0 | 166.4 | 61.8 | 55.8 | 16.6 |
| Toxicidade ⁽⁴⁾ | UT | 3.08 | 5.11 | 1.02 | 1.25 | 1.66 | 0.99 |

⁽¹⁾ Absorvência a 254 nm, diluição 1:50 ⁽²⁾ Absorvência a 580 nm, diluição 1:5 ⁽³⁾ Fenóis totais expressos em concentração de ácido tânico ⁽⁴⁾ 50% de inibição, durante uma exposição de 5 minutos

A comparação das características das frações revela, tal como antecipado, uma redução da carga orgânica, em termos de CQO e FT, e da cor desde a utilização da membrana GR40PP até à GR81PP. Porém, mais importante é a relação que pode ser estabelecida entre o

aumento da biodegradabilidade das frações para a sequência, a qual revela que a oxidação biológica dos poluentes está limitada, entre outros fatores, pela dimensão molecular.

A correlação entre a toxicidade e a dimensão das frações não é tão evidente, visto que a fração 2 não acompanha a redução para a sequência. De acordo com a classificação proposta por Bennett e Cuttage (1992) para resultados de Microtox obtidos com águas residuais, temos que a fração 5 é classificada como “não tóxica” (<1UT) enquanto a fração 1 é “extremamente tóxica” (>5 UT), e as frações intermédias, 2, 3 e 4, são consideradas “moderadamente tóxicas” (tabela 4.5). A relação menos evidente entre a toxicidade e os tamanhos moleculares, comparativamente à obtida para os índices de biodegradabilidade, é consequência dos resultados serem baseados nas consequências para o metabolismo de uma única bactéria marinha (*V. fischeri*) quando exposta a diluições do efluente; enquanto a avaliação da biodegradabilidade utiliza um inóculo contendo um largo espectro de bactérias cuja atividade suporta a depuração de efluente doméstico numa estação de tratamento de águas residuais. Assim, os resultados do bioensaio Microtox não são frequentemente representativos do efetivo impacto ambiental dos efluentes, exceto quando indicam ausência de toxicidade (Gutiérrez et al., 2002).

Na figura 4.3 apresentam-se os resultados do balanço mássico concretizado para os principais parâmetros que condicionam a depuração do efluente, nomeadamente a CQO, FT e A580 (cor). A informação apresentada permite conclusões muito interessantes, pois verifica-se que os compostos com massa superior a 100 kDa (fração 1) apresentam a principal contribuição para a CQO e cor do efluente proveniente de polifenóis com elevado peso molecular (elagitaninos, oligómeros e polímeros, taninos, entre outros) (Mingshu et al., 2006).

As frações 1 e 2, que à priori deveriam incluir os compostos de tamanho molecular acima de 50 kDa, representam 72%, 81% e 83% da totalidade de CQO, FT e cor, respetivamente. Este resultado é muito relevante, pois sugere que através de uma membrana com CEM igual a 50 kDa é possível atingir remoções significativas de poluentes e cor e recuperar até 75% do volume do efluente processado; ou seja, antecipa-se para as operações com membranas de UF com seletividade reduzida um retorno económico e ambiental muito interessante, pois os custos de implementação das TM acompanham a evolução do CEM (Mulder, 1998).

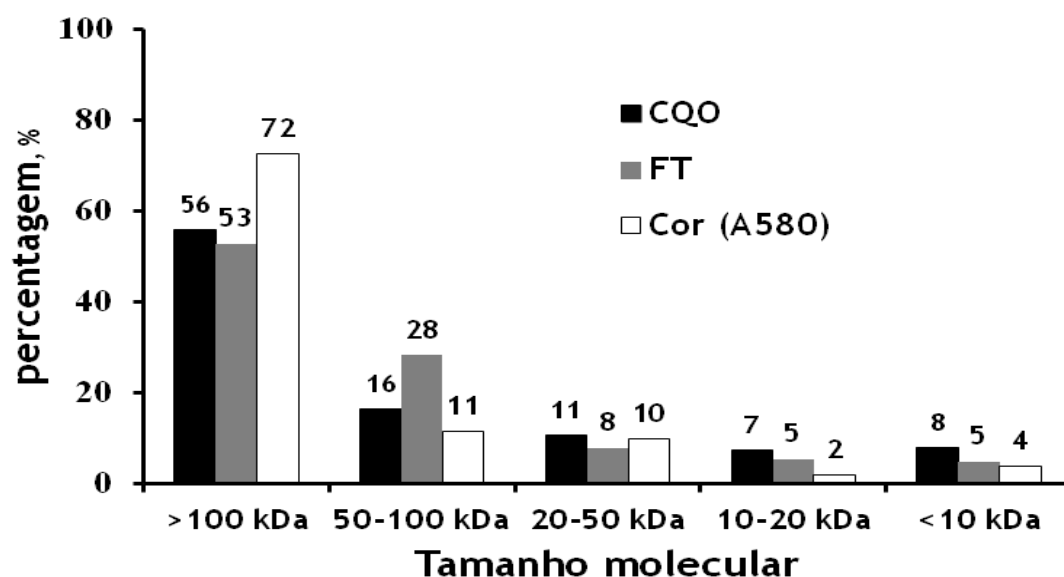


Figura 4.3 Perfis mássicos de distribuição da CQO, FT e cor.

Estas conclusões são reafirmadas pelas recuperações globais de CQO, FT, cor, as quais são próximas de 100%: 98.5%, 99.1% e 99.2%, respetivamente. Os resultados dos perfis de distribuição apresentados na figura 4.3 estão de acordo com a correlação linear entre os CEM e os valores de CQO, FT e cor, anteriormente referidos; permitindo concluir que os compostos orgânicos classificados como fenóis apresentam a principal contribuição para a elevada carga orgânica e coloração intensa do efluente do cozimento da cortiça.

A biodegradabilidade das frações aumenta significativamente da 1 para a 5 e, mais uma vez, correlaciona-se positivamente com a redução do tamanho molecular das mesmas (figura 4.4), com um incremento de CBO_5/CQO e CBO_{20}/CQO de 0.12 para 0.80 e de 0.25 para 0.93, respetivamente. Ao aumento dos índices de biodegradabilidade corresponde também o incremento da fração da matéria orgânica mais facilmente utilizada pelos microrganismos já que a razão CBO_5/CBO_{20} aumenta de 0.48 até 0.86, demonstrando que os compostos de tamanho molecular reduzido são mais suscetíveis e eficazmente sujeitos a oxidação biológica. Esta conclusão está de acordo com a literatura, a qual revela que os polímeros e os compostos orgânicos de grande tamanho molecular têm tendência para ser mais biorecalcitrantes que as moléculas menores, devido à dificuldade de aceder ao interior das células bacterianas (Hong e Xiao, 2013).

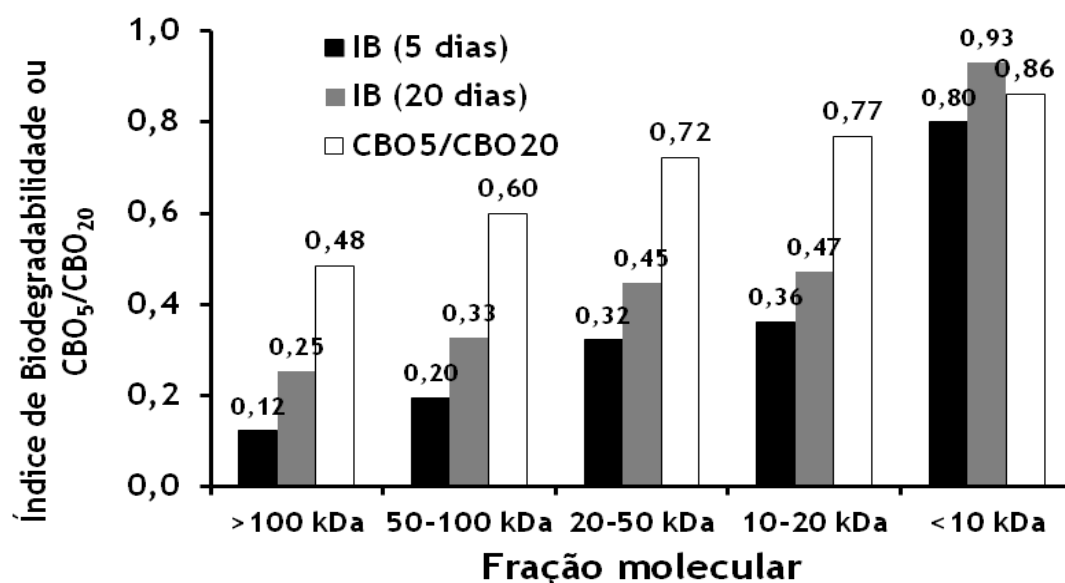


Figura 4.4 Índices de biodegradabilidade e razão CBO₅/CBO₂₀ das frações de UF.

A progressão do perfil fenólico das frações obtidas por UF encontra-se descrita no *subcapítulo 4.4*.

4.3 Oxidação química

Os resultados experimentais apresentados nos subcapítulos anteriores demonstram que a principal limitação à integração do tratamento biológico nos sistemas de depuração do efluente da operação de cozimento da cortiça ou dos concentrados produzidos por membranas de UF com CEM entre 10 e 100 kDa é determinada pela reduzida biodegradabilidade e elevada toxicidade. Neste contexto, a oxidação química pode contribuir para reduzir a carga orgânica e a cor do efluente ou das frações, contribuir para a fragmentação dos compostos com elevada massa molecular, reduzir a toxicidade e aumentar a biodegradabilidade.

Os procedimentos experimentais utilizados, durante os ensaios de oxidação química com ozono, encontram-se descritos no *subcapítulo 3.2.3*, enquanto as determinações analíticas efetuadas se encontram enumeradas no *subcapítulo 3.3*.

No âmbito do projeto de investigação o recurso à oxidação química através da aplicação de ozono já tinha sido estudada com amostras de efluente e os resultados obtidos revelaram uma efetiva redução da CQO e da cor acompanhadas pelo aumento dos índices de biodegradabilidade (N. Canto et al.). Porém, os resultados obtidos revelaram que o rendimento da oxidação vai-se reduzindo com o tempo de reação, ou seja, a fração do ozono

aplicado efetivamente consumida na oxidação dos poluentes decresce com o tempo (e quantidade).

Os ensaios de ozonização das frações foram realizados a pH natural (tabela 4.5) e as quantidades de ozono aplicadas foram fixadas de acordo com a CQO inicial das amostras com o objetivo de se atingirem razões de $O_3 \text{ aplicado}/CQO_{\text{inicial}}$ com valores próximos de 0.20, 0.30 e 0.40, as quais são significativamente inferiores às estudadas anteriormente com amostras de efluente que variaram entre 0.27 e 2.63 e permitiram remover entre 15.2 a 62% de CQO ($CQO_{\text{inicial}}=1\ 865\ \text{mg L}^{-1}$).

A tabela 4.6 apresenta as condições experimentais utilizadas e os resultados obtidos nos ensaios de oxidação química com razões de $O_3 \text{ aplicado}/CQO_{\text{inicial}}$ efetivas entre 0.15 e 0.60, cuja variação, relativamente aos valores programados, deveu-se a oscilações na produção de ozono. A quantidade de ozono foi intencionalmente limitada, visto que este é um reagente muito dispendioso (preço estimado em 23.10 € Kg^{-1}) e cuja eficiência decresce com a quantidade de ozono aplicada (ou tempo de reação), principalmente devido às reações com compostos não-alvo, ou seja, outros compostos que não os biorecalcitrantes ou inibitórios que se pretende degradar (Hoigné e Bader, 1976).

Tabela 4.6 Variação do pH, CQO, FT, A254, A580, razão estequiométrica e retenção do ozono obtidos nos ensaios de ozonização com as frações. (Condições experimentais: $T=20\ ^\circ\text{C} \pm 1\ ^\circ\text{C}$ e ozono aplicado entre 48.5 e 658.6 mg para tempos reacionais entre 3 e 32 minutos).

| Fração (#) Tamanho molecular | $\frac{O_{3,apl}}{CQO_i}$ | pH | Remoções (%) | | | | $\frac{g\ CQO_{rem}}{g\ O_{3\ cons.}}$ | Retenção de Ozono (%) |
|------------------------------------|---------------------------|------|--------------|------|------|------|--|--------------------------------|
| | | | CQO | FT | A254 | A580 | | |
| 1 >100 kDa | 0.20 | 4.20 | 59.4 | 88.3 | 78.4 | 90.6 | 3.75 | 78 |
| | 0.28 | 3.77 | 65.5 | 91.2 | 90.2 | 94.2 | 3.61 | 66 |
| | 0.38 | 3.42 | 69.4 | 92.0 | 91.1 | 96.5 | 3.40 | 53 |
| 2 50-100 kDa | 0.15 | 6.12 | 39.3 | 93.4 | 24.1 | 75.0 | 3.26 | 79 |
| | 0.25 | 6.05 | 43.2 | 95.0 | 43.6 | 83.3 | 2.54 | 69 |
| | 0.33 | 5.92 | 45.1 | 95.7 | 49.7 | 80.6 | 2.28 | 60 |
| 3 20-50 kDa | 0.15 | 5.88 | 35.7 | 72.6 | 44.2 | 58.5 | 2.40 | 76 |
| | 0.24 | 5.74 | 41.8 | 79.8 | 54.5 | 63.4 | 1.73 | 73 |
| | 0.31 | 5.16 | 48.2 | 81.8 | 58.7 | 61.0 | 1.55 | 71 |
| 4 10-20 kDa | 0.17 | 5.58 | 28.4 | 77.0 | 38.4 | 20.0 | 2.13 | 76 |
| | 0.29 | 5.39 | 35.9 | 71.7 | 52.0 | 20.0 | 1.84 | 67 |
| | 0.41 | 5.21 | 40.9 | 67.7 | 54.5 | 10.0 | 1.56 | 65 |
| 5 <10 kDa | 0.31 | 5.12 | 16.6 | 76.4 | 57.1 | 57.1 | 0.78 | 67 |
| | 0.60 | 5.01 | 29.0 | 77.5 | 64.9 | 71.4 | 0.73 | 64 |

Antes dos ensaios de oxidação, o pH das amostras encontrava-se entre a zona neutra e levemente acídica com valores entre 6.18 e 6.86 (tabela 4.5), os quais sofreram um decréscimo, após a ozonização, para valores compreendidos entre 3.42 e 6.12 (tabela 4.6), indicando que ocorreu uma oxidação forte. No caso da fração 1 que é constituída pelos compostos de maior tamanho molecular e elevada carga orgânica, a redução do pH foi de 6.18 para 4.20, 3.77 e 3.42, após 18, 25 e 32 minutos de oxidação, respetivamente. Assim, a oxidação da matéria orgânica está associada à redução do pH, uma vez que os compostos orgânicos são convertidos em derivados oxidados contendo grupos carboxílico cuja concentração depende da CQO inicial e do tempo reação (Hoigné e Bader, 1976).

No início da reação de ozonização, quando a mistura apresenta cargas orgânicas elevadas e o pH das mesmas se encontra próximo da neutralidade, a taxa da oxidação deve ser elevada e existe disponibilidade de radicais hidroxilo para reforçar a contribuição do ozono molecular. Assim, seria esperado que para razões reduzidas de $O_3 \text{ aplicado}/CQO_{\text{inicial}}$ o consumo de ozono fosse elevado (e a remoção de CQO fosse rápida), contudo com o decaimento do pH da solução ocorre uma redução da decomposição do ozono em radicais, da taxa de remoção de CQO e do rendimento da reação. Por exemplo, para a fração 1 o aumento da razão $O_3 \text{ aplicado}/CQO_{\text{inicial}}$ de 0.20 para 0.38 apenas contribuiu para o incremento das remoções de CQO, FT, compostos aromáticos e cor de 59.4 para 69.4%, de 88.3 para 92.0%, de 78.4 para 91.1% e de 90.6 para 96.5%, respetivamente. Além disto, observa-se que a ozonização das frações 1, 2, 3 e 4 foi bastante efetiva exibindo remoções de CQO, FT, compostos aromáticos e cor entre 28.4 e 69.4%, 67.7 e 95.7%, 24.1 e 91.1% e entre 38.4 e 91.1%, respetivamente (tabela 4.6). A fração 5 apresenta apenas uma concentração de poluentes residual (carga orgânica de 386 mg $O_2 \text{ L}^{-1}$) e uma cor pouco intensa, sendo o resultado da ozonização menos efetivo quando comparado com as restantes frações.

Verifica-se que existe uma clara tendência na eficácia do ozono, medida pela razão estequiométrica (razão entre o CQO removido e o ozono consumido: $g \text{ CQO}_{\text{removido}}/g \text{ O}_3 \text{ consumido}$), para diminuir com a redução da concentração de compostos orgânicos. Entre os compostos orgânicos presentes nas frações os classificados como fenólicos foram facilmente oxidados e apresentam, em todos os casos, remoções superiores às obtidas para CQO, variando entre 67.7 e 95.7% e 16.6 e 69.4%, respetivamente. A avaliação da oxidação dos poluentes pode também ser indiretamente avaliada através dos rendimentos de retenção do ozono, ou seja, da fração de ozono fixada na solução aquosa. Estes valores foram também calculados e são apresentados na tabela 4.6.

As razões estequiométricas situaram-se entre 0.73 e 3.75, sendo superiores a 1.56 para ensaios de oxidação com as frações entre 1 e 4 (tamanho molecular superior a 10 kDa), mas variam apenas entre 0.73 e 0.78 nos ensaios com a fração 5. Estes resultados corroboram com a possibilidade de perda de substratos disponíveis à oxidação, como foi anteriormente

mencionado, nomeadamente devido à redução da concentração de compostos fenólicos entre as frações 1 e 5 (de 233 mg L⁻¹ para 16.6 mg L⁻¹, respetivamente).

Os rendimentos de retenção de ozono foram superiores a 53% para os intervalos de oxidações testados e podem ser justificados pela elevada concentração de compostos orgânicos saturados, tais como taninos, compostos aromáticos e fenólicos de tamanhos moleculares elevados (da fração 1 à 4, acima de 10 kDa), os quais são muito sensíveis ao ataque do ozono molecular devido aos numerosos grupos com eletrões disponíveis. Todavia, a retenção do ozono diminui, tal como antecipado, devido à redução da concentração de compostos orgânicos disponíveis para serem oxidados.

Em relação aos resultados obtidos para a descoloração das amostras, obtiveram-se valores muito elevados, nomeadamente nos ensaios com as frações 1 a 3, os quais estão compreendidos entre 58.5 e 96.5%. Estes resultados são relevantes se atendermos a que os compostos com dimensão superior a 50 kDa (fração 1 e 2) determinam 93% da cor do efluente.

Porém, o principal objetivo da ozonização neste estudo foi obter o aumento dos índices de biodegradabilidade e reduzir a toxicidade das frações, permitindo a formação de produtos de oxidação intermediários com peso molecular inferior ao inicial, mais oxigenados e polares, aumentando assim a sua suscetibilidade à oxidação biológica. Os resultados da variação dos índices utilizados para avaliar a biodegradabilidade das frações antes e após a ozonização são apresentados na figura 4.5; verificando-se que a eficácia da ozonização para aumentar a biodegradabilidade diminui da fração 1 (>100 kDa) para a 5 (<10 kDa), o que sugere que o tamanho molecular dos compostos orgânicos tem um papel muito importante, tal como já tinha sido anteriormente estabelecido através da análise das frações (tabela 4.5) e que pode ser ultrapassado através da oxidação química com ozono.

No caso da fração 5, a biodegradabilidade inicial já era elevada e o resultado da oxidação não é claro e a ação do ozono é limitada pelo valor da CQO (386 mg L⁻¹). A oxidação da fração com maior carga orgânica, fração 1 (com CQO de 3 436 mg L⁻¹) permite obter um incremento significativo das razões CBO₅/CQO e CBO₂₀/CQO de 0.12 para 0.25 e de 0.25 para 0.56, respetivamente. Os resultados obtidos permitem estabelecer uma correlação linear entre o incremento da biodegradabilidade e a ozonização com valores de declive que diminuem com a redução da dimensão dos poluentes, ou seja, o retorno da ozonização reduz-se com a redução da massa molecular dos compostos.

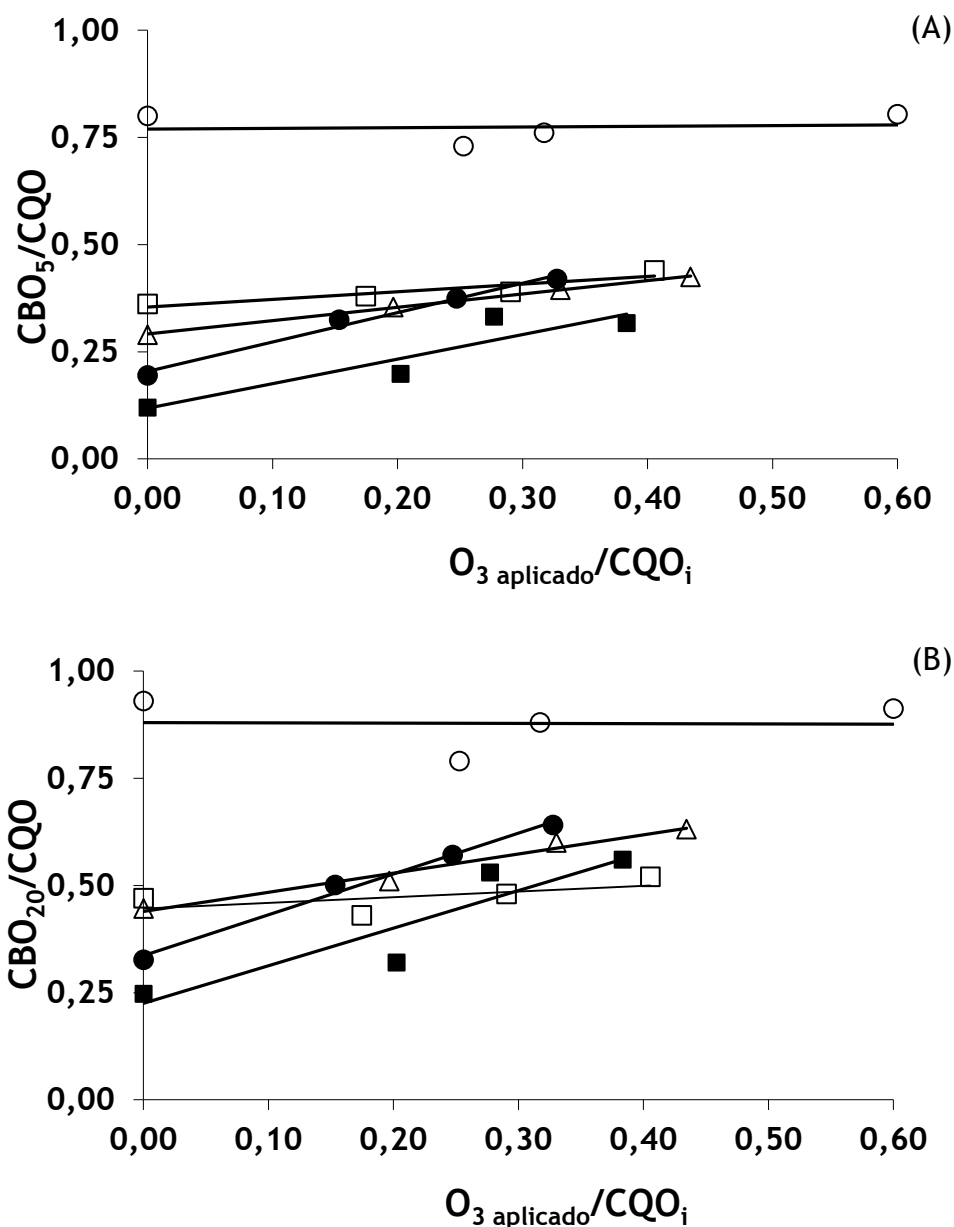


Figura 4.5 Variação da biodegradabilidade para as razões (A) CBO_5/CQO e (B) CBO_{20}/CQO com a razão $O_3 \text{ aplicado}/CQO_{\text{inicial}}$ (\blacksquare) >100 kDa, (\bullet) 50-100 kDa, (Δ) 20-50 kDa, (\square) 10-20 kDa and (\circ) <10 kDa.

Optou-se por não concretizar a avaliação da toxicidade aguda das frações, após oxidação química, através do Microtox por razões económicas e devido às discrepâncias anteriormente registadas entre a biodegradabilidade e a toxicidade na análise das frações antes da ozonização. No entanto, considerou-se a falta de especialização e adaptação da biomassa utilizada como inóculo nos bioensaios para determinação da CBO e as representações gráficas da progressão do consumo de oxigénio com o tempo de incubação suficientes para garantir que a biomassa aeróbia permite obter uma eliminação dos poluentes, possibilidade que exclui fenómenos de inibição ou toxicidade.

O perfil fenólico das frações, antes e após a ozonização, encontra-se descrito *no subcapítulo 4.4*.

4.4 Progressão do perfil fenólico das frações antes e após a ozonização

A concentração de vários poluentes, nomeadamente dos ácidos gálico, siríngico, protocatecuico, elágico e tânico e dos aldeídos vanílico e protocatecuico, foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e os cromatogramas obtidos permitiram comparar o perfil fenólico das frações antes e após a oxidação química com ozono.

Na tabela 4.7 são apresentadas as razões de recuperação dos poluentes específicos quantificados por HPLC e expressas em percentagem, após o fracionamento e a ozonização (de acordo com a quantidade de ozono aplicada), calculadas pelo balanço mássico recorrendo aos resultados das análises realizadas a todas as frações. Estes cálculos tiveram como referência o volume de efluente processado e as concentrações obtidas (tabela 4.2).

Os resultados da tabela 4.7 apresentam diferenças muito significativas relativamente aos obtidos para a distribuição mássica da CQO, dos FT e da cor das frações (figura 4.3), tendo-se obtido uma inesperada variação das razões de recuperação entre 3 e 442%, as quais traduzem, respetivamente, uma significativa eliminação e incremento da concentração de alguns compostos. Por exemplo, o ácido elágico apresenta uma recuperação superior a 4 vezes o valor quantificado no efluente do cozimento da cortiça (2.42 mg L^{-1}). Outra observação relevante diz respeito à presença destes compostos, cujas massas moleculares variam entre 130 e 1 700 Da, nas frações 1 a 4 em vez de concentrarem na fração 5 (<10 kDa), ocorrendo uma única exceção para o ácido siríngico (198 Da) que só existe na fração 5 em concentração que determina uma razão de recuperação de 36%, ou seja, apresentado uma perda significativa.

Porém, os resultados obtidos antes da oxidação além de indicarem a ocorrência significativa de degradação de alguns compostos, sugerem a possibilidade de inter-conversão entre os compostos analisados e a acumulação de outros obtida por fragmentação de polímeros com elevado tamanho molecular, os quais não foram quantificados, mas cuja presença no efluente foi revelada pela redução da CQO e dos FT obtida pelas membranas de UF.

Tabela 4.7 Razões de recuperação de poluentes específicos (%), após o fracionamento e a ozonização (todas as frações incluídas).

| Composto | Após fracionamento por UF | Após oxidação, $\frac{O_{3,apl}}{CQO_i}$ | | |
|------------------------|------------------------------|--|------|------|
| | | 0.20 | 0.40 | 0.60 |
| Ácido Gálico | 15 | 5 | 5 | 5 |
| Ácido Protocatecuico | 3 | 0 | 0 | 0 |
| Aldeído Protocatecuico | 37 | 69 | 130 | 52 |
| Ácido Siringico | 36 | 0 | 0 | 0 |
| Aldeído Vanílico | 199 | 0 | 0 | 0 |
| Ácido Elágico | 442 | 49 | 104 | 49 |
| Ácido Tânico | 330 | 353 | 408 | 415 |

Vários dos compostos presentes neste tipo de efluente, nomeadamente os polifenóis com propriedades antioxidantes, antioxiogénicas e varredores de radicais, apresentam elevada suscetibilidade à oxidação e hidrólise por exposição ao ar na presença de ácidos ou base (Santos et al., 2010). Consequentemente, as condições durante os ensaios de UF, nomeadamente da primeira etapa do processo com um fluxo turbulento cuja duração foi superior a 15 horas, permitiram a ocorrência de reações complexas de clivagem, associação e degradação dos compostos orgânicos presentes no efluente. A ocorrência fácil deste tipo de reações foi confirmada através de uma experiência simples que consistiu em colocar uma amostra do efluente do cozimento da cortiça num gobelé, à temperatura ambiente e sob agitação moderada, durante 11 dias. Na figura 4.6 apresenta-se a comparação entre o cromatograma inicial e final, a qual traduz uma significativa variação na composição. Os resultados da quantificação revelam variações de concentração significativas para alguns compostos, por exemplo a concentração do ácido gálico aumenta de 2.46 para 3.79 mg L⁻¹ e a do ácido elágico reduz-se de 2.92 para 1.90 mg L⁻¹; estes resultados podem ser interpretados como consequência da degradação do ácido elágico em ácido gálico e sua consequente acumulação (2 moléculas por cada molécula de ácido elágico fragmentada) ou pela degradação de galotaninos (derivados de ácido gálico) (Landete, 2011).

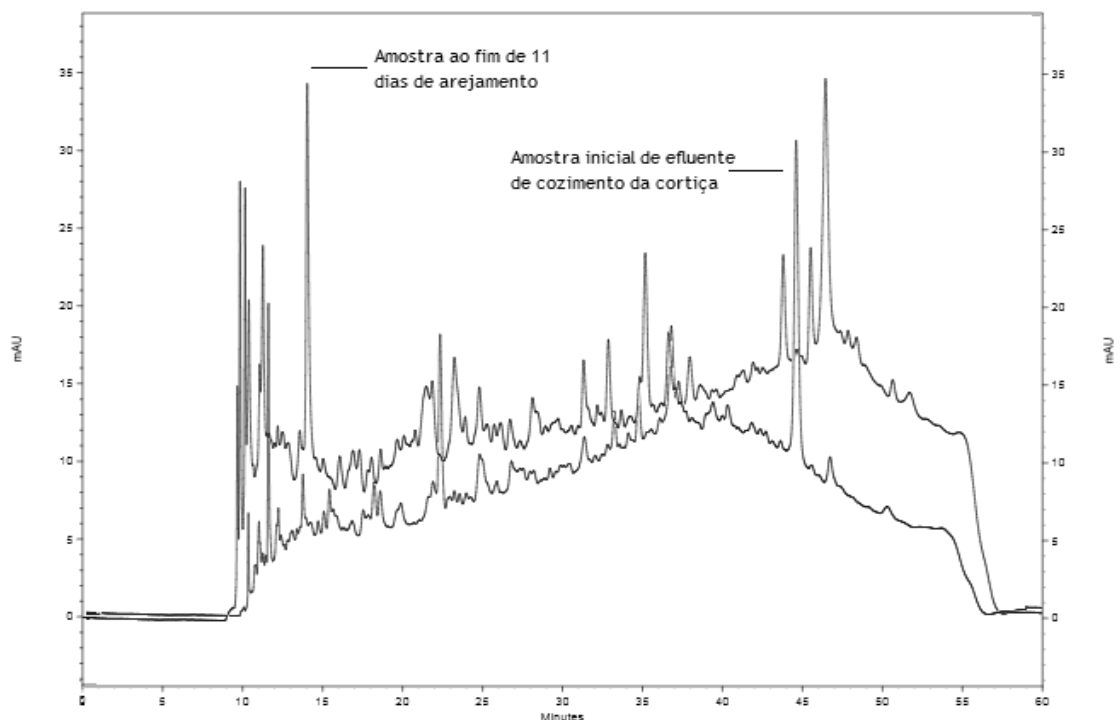


Figura 4.6 Cromatogramas de HPLC-DAD da amostra de efluente do cozimento da cortiça inicial e ao fim de 11 dias de arejamento e agitação. Condições experimentais: temperatura ambiente e agitação moderada.

As condições em que foi concretizado o processo de fracionamento do efluente resultaram no significativo aumento das razões de recuperação do aldeído vanílico e dos ácidos tânico e elágico, 199%, 330% e 442%, respetivamente. Estes valores nitidamente superiores a 100% confirmam a ocorrência da clivagem de compostos com elevada massa molecular contendo estas unidades. Os restantes compostos fenólicos (ácidos gálico, protocatecuico e siringico e aldeído protocatecuico) apresentam valores inferiores a 100% e consistentes com a sua degradação ou conversão, como é o caso da correlação inversa entre o ácido gálico e elágico com taxas de recuperação de 15 e 442%, respetivamente. O resultado elevado do ácido elágico pode assim ser justificado pela reação entre dois ácidos gálicos ou pela hidrólise de elagitaninos (Landete, 2011). Por outro lado, a recuperação do ácido tânico foi de 330%, com concentrações entre 5.92 e 43.58 mg L⁻¹ para a fração 2 e 5, respetivamente; esta taxa de recuperação pode resultar da degradação ou clivagem de taninos (metabólitos comuns de plantas), através da hidrólise ou oxidação catalizadas por diferentes enzimas, ao longo do processo sequencial de UF (Mingshu et al., 2006).

A comparação entre as estruturas moleculares dos ácidos gálico e tânico (figura 4.7) conduziram à investigação da possibilidade de obter ácido tânico por reação entre o ácido gálico e a glucose presentes numa solução aquosa numa razão estequiométrica de 10:1, à temperatura ambiente sob agitação moderada. Após 1 hora a quantificação dos compostos

revelou que a concentração inicial de ácido gálico foi reduzida de 600 mg L⁻¹ para 283 mg L⁻¹ e a concentração de ácido tânico obtida foi 31.3 mg L⁻¹; valores que estão de acordo com a estequiometria da reação proposta. Na figura 4.8 comparam-se os cromatogramas da mistura inicial do ácido gálico e da glucose e após 1 hora de reação.

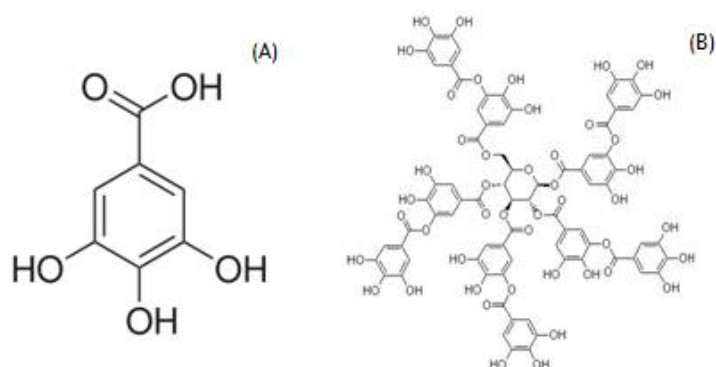


Figura 4.7 Estruturas moleculares do (A) ácido gálico e do (B) ácido tânico.

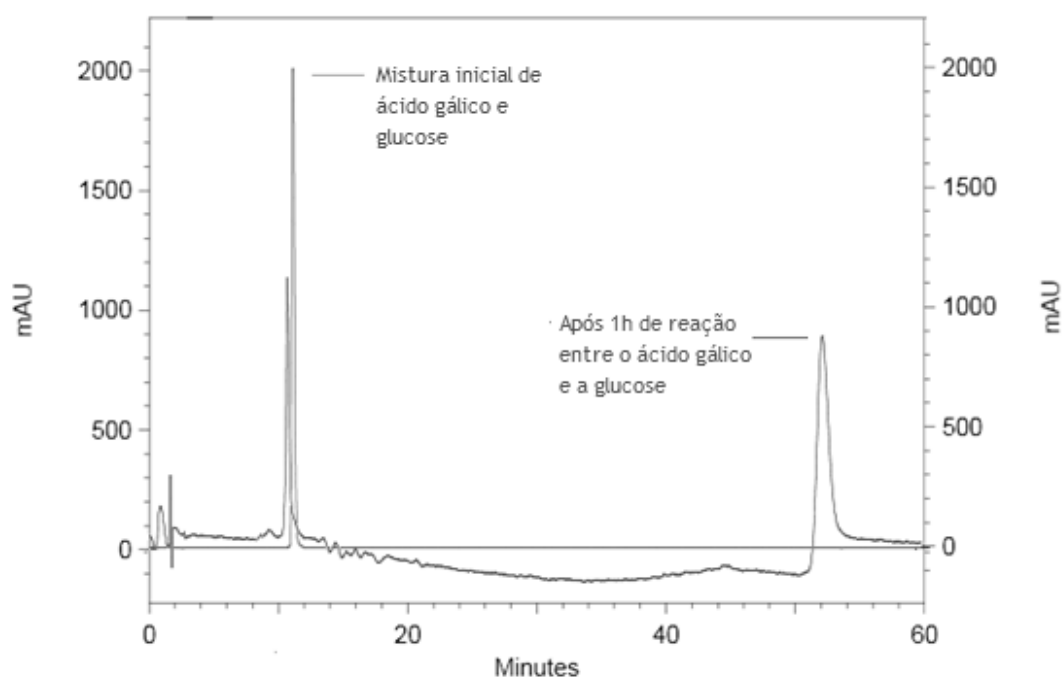


Figura 4.8 Cromatogramas de HPLC-DAD da mistura reacional com 600 mg L⁻¹ de ácido gálico (11.05 minutos) e 60 mg L⁻¹ de glucose (não detetada), antes e após 1h de reação, com formação de ácido tânico (52.30 minutos). Condições experimentais: temperatura ambiente e agitação moderada.

Apesar das quantidades reduzidas de ozono utilizadas nas reações de oxidação das frações obteve-se a remoção completa de alguns poluentes, nomeadamente aldeído vanílico e ácidos protocatecuico e siríngico. Porém, as reações complexas entre os compostos fenólicos continuaram a ocorrer durante a ozonização, resultando em aumentos das concentrações do aldeído protocatecuico e do ácido tânico. Neste último caso, verificou-se um aumento da taxa de recuperação de 330% (após o fracionamento) até 415% através da oxidação química. Este resultado pode ser interpretado considerando que o efluente do cozimento da cortiça contém compostos orgânicos de grande dimensão molecular cuja clivagem oxidativa origina ácido tânico e aldeído protocatecuico, numa taxa superior à da sua degradação pelo ozono. Situações intermédias de remoções parciais foram observadas com os ácidos gálico e elágico e podem resultar da coexistência de reações que conduzem a aumentos de concentração e de degradação de compostos.

5. Considerações finais

Os resultados da caracterização do efluente do cozimento da cortiça, operação crítica na salvaguarda da qualidade dos produtos, nomeadamente das rolhas, confirmaram ser atualmente um dos principais desafios enfrentados pela indústria. O efluente apresenta uma coloração castanho-escuro intensa associada a uma elevada carga orgânica, com CQO igual a $1\,536\text{ mg L}^{-1}$ e uma concentração de fenóis totais de $110.3\text{ mg ácido tânico L}^{-1}$, e uma toxicidade de 3.08 UT (toxicidade moderada) para a espécie marinha *Vibrio fischeri* (Microtox). O efluente caracteriza-se também por uma reduzida biodegradabilidade, com valores de 0.26 e 0.36 para as razões CBO_5/CQO e $\text{CBO}_{20}/\text{CQO}$, respetivamente; confirmando uma significativa limitação à depuração que pode ser obtida por tratamento biológico.

Esta investigação pretendeu caracterizar os compostos orgânicos concentrados em frações com diferentes dimensões moleculares produzidas recorrendo a membranas de UF com coeficientes de exclusão molecular iguais a 100, 50, 20 e 10 kDa. A sucessiva utilização das membranas em operações em descontínuo até ser obtido um $\text{VRF}=4$ permitiu obter 5 frações (>100 kDa, 50-100 kDa, 20-50 kDa, 10-20 kDa e <10 kDa) recorrendo à determinação da CQO, CBO_5 e CBO_{20} , COT, FT, A254, A580 e à quantificação de poluentes específicos, ácidos gálico, protocatecuico, siríngico, elágico e tânico e aldeídos protocatecuico e vanílico, através de HPLC-DAD e LC-MS. Obteve-se uma correlação linear entre a CQO, FT e cor e os CEM das membranas e observou-se um incremento da biodegradabilidade e uma redução da toxicidade com a redução da dimensão; permitindo identificar a dimensão dos compostos com um dos principais constrangimentos à oxidação biológica. Os resultados da caracterização foram utilizados para obter os perfis mássicos de distribuição da CQO, FT e cor, os quais revelaram que 56%, 53% e 72% dos valores globais correspondem a compostos com tamanho molecular superior a 100 kDa. Adicionalmente, pode concluir-se que os polifenóis de maior tamanho molecular são os principais responsáveis pela elevada carga orgânica e coloração intensa do efluente.

A carga orgânica nas frações apresentou uma CQO entre $3\,436$ e 386 mg L^{-1} e uma concentração de FT entre 233 e 16.6 mg L^{-1} . O recurso à oxidação química através da aplicação de quantidades de ozono limitadas, em que a variação da razão $\text{O}_3\text{ aplicado}/\text{CQO}_{\text{inicial}}$ estiveram entre 0.15 e 0.60, permitiu reduzir a CQO e a cor entre 16.6 e 69.4% e de 10 a 96.5%, respetivamente. Além disso, também permitiu um significativo aumento dos índices de biodegradabilidade CBO_5/CQO e $\text{CBO}_{20}/\text{CQO}$ de 0.26 para 0.80 e de 0.36 para 0.93, respetivamente. O retorno da oxidação química decresceu com a redução da dimensão dos poluentes, deixando de ser relevante para as frações 4 e 5 (10-20 kDa e <10 kDa) confirmando a massa molecular como um entrave à biodegradação. Porém, através do ajuste da seletividade das membranas e da extensão da oxidação química dos concentrados é possível

aumentar a biodegradabilidade até aos níveis necessários para o tratamento biológico subsequente.

A análise dos cromatogramas obtidos confirmou a composição complexa do efluente com mais de 50 compostos orgânicos presentes e para os poluentes específicos quantificados através de retas de calibração a concentração variou entre 0.22 e 7.60 mg L⁻¹ para os ácidos siríngico e tânico, respetivamente. Foi inesperado obter razões de recuperação, expressas em percentagem incluindo todas as frações, antes e após oxidação, entre 3 e 442% e entre 0 e 415%, respetivamente. Estas diferenças de valores podem ser justificadas pela ocorrência de reações complexas de oxidação e hidrólise que resultam na clivagem de grandes compostos e contribuem para o aumento da concentração de outros com menor tamanho molecular. Exceto no caso do ácido siríngico, estas reações determinaram a presença dos restantes poluentes específicos em frações superiores a 10 kDa, contribuindo para taxas de recuperação superiores a 100%. Através da oxidação química com ozono, os ácidos protocatecuico e siríngico foram totalmente eliminados; enquanto os ácidos gálico e elágico foram parcialmente reduzidos e a concentração de ácido tânico aumentou.

A elevada propensão para estas reações ocorrerem foi testada através da realização de duas experiências: no primeiro caso, mostrou-se que é possível existir oscilações no perfil fenólico das amostras, por exposição ao ar; e no segundo caso, provou-se a ocorrência de reações de degradação e conversão entre os compostos, a partir de uma mistura de 10:1 de ácido gálico e glucose; obtendo-se após 1 hora a formação de ácido tânico e a redução do ácido gálico, sob agitação moderada.

5.1 Perspetivas futuras

Portugal ocupa, de forma consolidada, a liderança mundial na produção e transformação de cortiça, como tal é nossa convicção que a linha de investigação iniciada pelo projeto de investigação financiado pela FCT (PTDC/AGR-AAM/102042/2008) deve ser prosseguida e contribuir para a redução do consumo de água e das emissões poluentes. Como tal, em seguida são apresentadas algumas sugestões sobre perspetivas para trabalho futuro:

- ✓ Utilização de membranas mais seletivas, de UF com menor CEM e de NF;
- ✓ Otimização das condições experimentais da oxidação química com ozono;
- ✓ Avaliação de tecnologias de oxidação química alternativas ao ozono;
- ✓ Aumento do conhecimento da composição do efluente recorrendo a análise por cromatografia líquida e/ou gasosa, para potencial recuperação de espécies químicas com interesse comercial e elucidação das reações químicas complexas que ocorrem.

Bibliografia

Al Momani, F. A.; Shawaqfeha, A. T.; Al-Zoubib, H.; 2010. Comparison of different treatment alternatives for removal of pesticide from water solution. *J Chem Technol Biotechnol*; 85: 529-535

Alsheyab, M. A. T.; Muñoz, A.; 2007. Optimisation of ozone production for water and wastewater treatment. *Desalination*, 217: 1-7.

APCOR, 2012. Cortiça - Cork 2012, Portuguese Cork Association, Santa Maria de Lamas, Portugal

APHA, 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed. Washington, DC, USA

Azur Environment, 2002. *Microtox Model 500 Operation Manual*, Berkshire, UK.

Balcioğlu, I.A, Saraç, C., Kivılcımdan, C., Tarlan, E., 2006. Application of Ozonation and Biotreatment for Forest Industry Wastewater. *Ozone: Science & Engineering: The Journal of the International Ozone Association*, 28 (6), 431-436.

Benítez, F., Acero, J., Leal, A., 2008 (b). Treatment of wastewaters from the cork process industry by using ultrafiltration membranes. *Desalination* 229 (1-3), 156-169.

Benítez, F., Leal, A., Real, F., Acero, J., Roldán, G., 2008 (a). Elimination of organic matter present in wastewaters from the cork industry by membrane filtration. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 83: 309-316.

Benitez, F.J., Acero, J.L., Garcia, J., Leal, A.I., 2003. Purification of cork processing wastewaters by ozone, by activated sludge, and by their two sequential applications. *Water Research* 37 (17), 4081-4090.

Benítez, F.J., Acero, J.L., Leal, A.I., 2006. Application of microfiltration and ultrafiltration processes to cork processing wastewaters and assessment of the membrane fouling. *Separation and Purification Technology* 50 (3), 354-364.

Benítez, F.J., Acero, J.L., Leal, A.I., Gonzalez, M., 2009. The use of ultrafiltration and nanofiltration membranes for the purification of cork processing wastewater. *Journal of Hazardous Materials* 162 (2-3), 1438-1445.

Benitez, J.; Beltrán-Heredia, J.; Acero, J.; Rubio, F.; 2000. Rate constants for the reactions

of ozone with chlorophenols in aqueous solutions; *Journal of Hazardous Materials B79*: 271-285.

Bennett J, Cuttage J.; 1992. Review and evaluation of Microtox test for freshwater sediments; Report of the Washington State Department of Ecology, Olympia, Washington; 32 pp.

Bernardo, M., Santos, A., Cantinho, P., Minhalma, M., 2011. Cork industry wastewater partition by ultra/nanofiltration: A biodegradation and valorisation study. *Water Research* 45 (2), 904-912.

Buendía, I. M.; Fernández, F. J.; Villasenör, J.; Rodríguez, L.; 2008. Biodegradability of meat industry wastes under anaerobic and aerobic conditions. *Water Research*, 42: 3767-3774.

C. Santos, D.; 2011. Avaliação e controlo da toxicidade de efluentes industriais; Projeto de Licenciatura, Universidade da Beira Interior.

C. Santos, D.; Silva, L.; Albuquerque, A.; Simões, R.; C. Gomes, A.; Horizontal Subsurface Flow Constructed Wetlands for Cork Industry wastewater treatment. (projeto em curso).

Cadahía, E., Conde, E., Fernández de Simón, B., Garcia-Vallejo, M. C.; 1998. Changes in tannic composition of reproduction cork *Quercus suber* throughout industrial processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2332-2336.

Da Piedade Silva, T.; 2011. Avaliação dos antioxidantes presentes nas águas de processo da indústria corticeira. Dissertação de Mestrado, Universidade Nova de Lisboa.

Dias Machado, M. M.; 2005. Degradação biológica de polifenóis: Isolamento e Caracterização de Bactérias Mesofílicas e Termofílicas de Água de Cozedura de Cortiça. Dissertação de Mestrado, Universidade do Porto, Portugal.

Dias-Machado, M., Madeira, L.M., Nogales, B., Nunes, O.C., Manaia, C.M., 2006. Treatment of cork boiling wastewater using chemical oxidation and biodegradation. *Chemosphere*, 64 (3), 455-461.

Dimitrov, S.; Pavlov, T.; Nedelcheva, D.; Reuschenbach, P.; Silvani, M.; Bias, R.; Comber, M.; Low, L.; Lee, C.; Parkerton, T.; Mekenyan, O.; (2007): A kinetic model for predicting biodegradation, SAR and QSAR in Environmental Research, 18:5-6, 443-457.

- Fernandes, A.; Sousa, A.; Mateus, N.; Cabral, M.; Freitas, V.; 2011. Analysis of phenolic compounds in cork from *Quercus suber* L. by HPLC-DAD/ESI-MS. *Food Chemistry* 125: 1398-1405.
- Guedes, A.M.F.M., Madeira, L.M.P., Boaventura, R.A.R., Costa, C.A.V., 2003. Fenton oxidation of cork cooking wastewater—overall kinetic analysis. *Water Research* 37 (13), 3061-3069.
- Gutiérrez, M., Etxebarria, J., de las Fuentes, L., 2002. Evaluation of wastewater toxicity: comparative study between Microtox and activated sludge oxygen uptake inhibition. *Water Research* 36 (4), 919-924.
- Heredia, J. B.; Domínguez, J. R.; López, R.; 2004 (a). Advanced oxidation of cork-processing wastewater using Fenton's reagent: Kinetics and stoichiometry. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79: 407-412.
- Heredia, J. B.; Domínguez, J. R.; López, R.; 2004 (b). "Treatment of cork process wastewater by a successive chemical-physical method". *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 52: 4501-4507.
- Hoigné, J., Bader, H., 1976. The role of hydroxyl radical reactions in ozonation processes in aqueous solutions. *Water Research* 10 (5), 377-386.
- Hong, P., Xiao, T., 2013. Treatment of oil spill water by ozonation and sand filtration. *Chemosphere* 91 (5), 641-647.
- Insa, S., Salvadó, V., Anticó, E., 2006. Assays on the simultaneous determination and elimination of chloroanisoles and chlorophenols from contaminated cork samples. *Journal of Chromatography A*, 1122 (1-2), 215-221.
- Landete, J., 2011. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: A review about source, metabolism, functions and health. *Food Research International* 44 (5), 1150-1160.
- Makkar, H., Blummel, M., Brorowy, M., Becker, N., 1993. Gravimetric determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 61 (2), 161-165.
- Martins, R., Jiménez, B., Castro-Ferreira, S., Quinta-Ferreira, R., 2012. Enhancing agro-industrial wastewaters depuration by ozone oxidation. *Ozone: Science & Engineering* 34 (5), 387-396.

Mendonça, E., Pereira, P., Martins, A., Anselmo, A., 2004. Fungal biodegradation and detoxification of cork boiling wastewaters. *Engineering in Life Sciences* 4 (2), 144-148.

Mendonça, E., Picado, A., Silva, L., Anselmo, A.M., 2007. Ecotoxicological evaluation of cork-boiling wastewaters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66 (3), 384-390.

Metcalf, I. Eddy, 1991. *Wastewater Engineering Treatment Disposal Reuse*, 3rd ed., McGraw Hill International Editions, Singapore.

Mingshu, L.; Kai Y.; Qiang, H.; Dongying, J.; 2006. Biodegradation of gallotannins and ellagitannins. *J. Basic Microbiol.* 46: 1, 68-84.

Minhalma, M., de Pinho, M., 2001. Tannic-membrane interactions on ultrafiltration of cork processing wastewaters. *Separation and Purification Technology* 22-23 (1), 479-488.

Monteleone, E.; Condelli, N.; Dinnella, C.; Bertuccioli, M.; 2004. Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds; *Food Quality and Preference* 15: 761-769.

Mulder, M. 1997. *Basic Principles of Membrane Technology*, 2nd Ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

N. Canto, L. Silva, R. Simões, A. Albuquerque, A. C. Gomes; "Toxicity reduction and biodegradability enhancement of cork processing wastewaters"; *Water Science and Technology* (Submetido para publicação)

Nystrom, M., Jarvinen, P., 1991. Modification of polysulphone ultrafiltration membranes with UV irradiation and hydrophilicity increasing agents. *Journal of Membrane Science* 60 (2-3) 275-296.

Oller, I., Malato, S., Sánchez-Pérez, J., 2011. Combination of Advanced Oxidation Processes and biological treatments for wastewater decontamination - A review. *Science of the Total Environment* 409 (20), 4141-4166.

Pereira, H., 2007. *Cork: Biology, Principles and Uses*, 1^a ed. Elsevier, Amsterdão, Holanda.

Peres, J.A., Heredia, J.B., Domínguez, J.R., 2004. Integrated Fenton's reagent-coagulation/flocculation process for the treatment of cork processing wastewaters. *Journal of Hazardous Materials* 107 (3), 115-121.

Pintor, A.M.A., Vilar, V.J.P., Boaventura, R.A.R., 2011. Decontamination of cork wastewaters by solar-photo-Fenton process using cork bleaching wastewater as H₂O₂ source. *Solar Energy* 85 (3), 579-587.

Reuschenbach, P.; Pagga, U.; Strotmann, U.; 2003. A critical comparison of respirometric biodegradation tests based on OECD 301 and related test methods. *Water Research*, 37: 1571-1582.

Roppola, K.; 2009. Environmental applications of manometric respirometric methods. Academic dissertation, Faculty of Science of the University of Oulu, Finland.

Santos, S., Pinto, P., Silvestre, A., Neto, C., 2010. Chemical composition and antioxidant activity of phenolic extracts of cork from *Quercus suber* L. *Industrial Crops and Products* 31 (3), 521-526.

Silva, C., Madeira, L., Boaventura, R., Costa, C., 2004. Photo-oxidation of cork manufacturing wastewater. *Chemosphere* 55 (1), 19-26.

System OxiTop Control - Operating Manual, WTW (1998) Germany.

Teixeira, A.R.S., Santos, J.L.C., Crespo, J.G., 2009. Sustainable membrane-based process for valorisation of cork boiling wastewaters. *Separation and Purification Technology*, 66 (1), 35-44.

Vilar, V. J. P.; Maldonado, M. I.; Oller, I.; Malato, S.; Boaventura, R. A. R.; Solar treatment of cork boiling and bleaching wastewaters in a pilot plant. *Water Research*, 43: 4050-4062.

Wagland, S. T.; Tyrrel, S. F.; Godley, A. R.; Smith, R.; 2009. Test methods to aid in the evaluation of the diversion of biodegradable municipal waste (BMW) from landfill. *Waste Management*, 29 (2009) 1218-1226.

Wu, J.L., Wu, C.C., Ma, H.W., Chang, C.C., 2004. Treatment of landfill leachate by ozone-based advanced oxidation processes. *Chemosphere* 54 (7), 997-1003.

Yan Lan, B., Nigmatullin, R., Puma, G.L., 2008. Ozonation kinetics of cork-processing water in a bubble column reactor. *Water Research* 42 (10-11), 2473-2482.

Anexos

Anexo 1

Neste anexo, é apresentado o protocolo experimental para as determinações da biodegradabilidade aeróbia, da preparação de biomassa para os ensaios de CBO e dos fenóis totais, bem como os reagentes utilizados e preparação/composição dos mesmos.

Protocolo experimental para determinação de CBO

Em cada frasco (310 mL de capacidade total) deve introduzir-se:

- ✓ 0.8 mL de solução de macro nutrientes;
- ✓ 0.4 mL de solução de micro nutrientes;
- ✓ 1.2 mL de solução de tampão fosfato (pH 7.2);
- ✓ 0.4 mL de solução de cloreto de amónio;
- ✓ 2 mL de biomassa aeróbia;
- ✓ Diluição da amostra com pH corrigido entre 6.5 e 7.5.

Após introduzir estes elementos, o volume deve ser ajustado a 100 mL com água destilada.

1. Antes de se fecharem os frascos, é necessário introduzir NaOH no topo de cada frasco para fixar o dióxido de carbono que é libertado durante o ensaio.
2. Após fechar os frascos, estes são introduzidos numa incubadora, sob agitação constante, à temperatura de $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 2 horas para estabilizar a temperatura, previamente ao início do ensaio.
3. Quando a temperatura atinge valores estáveis, o ensaio tem início usando-se um controlador OxiTop que irá medir o oxigénio consumido, durante o ensaio.
4. Ao fim do ensaio (5 ou 20 dias), os resultados são recolhidos com o controlador OxiTop.
5. Finalmente, os resultados são transferidos do controlador OxiTop para o computador.

O branco é preparado da mesma forma que as amostras, sendo o volume da amostra substituído por água destilada; no caso das amostras padrão, o volume da amostra é substituído por uma solução de glucose e ácido glutâmico.

Reagentes:

- ✓ Solução de macro nutrientes: $27.7 \text{ g L}^{-1} \text{ CaCl}_2$, $101 \text{ g L}^{-1} \text{ MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $4.84 \text{ g L}^{-1} \text{ FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.
- ✓ Solução de micro nutrientes: $40 \text{ mg L}^{-1} \text{ MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $57 \text{ mg L}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$, $43 \text{ mg L}^{-1} \text{ ZnCl}_2$, $35 \text{ mg L}^{-1} (\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $100 \text{ mg L}^{-1} \text{ EDTA}$.
- ✓ Solução de glucose e ácido glutâmico: 15 g L^{-1} glutamic acid and 15 g L^{-1} glucose. Antes de preparar esta solução, é necessário secar os reagents a 103°C , durante 1 horas.
- ✓ Solução de cloreto de amónio: $38.2 \text{ g L}^{-1} \text{ NH}_4\text{Cl}$.
- ✓ Solução tampão de fosfato: $0.1 \text{ M NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.1 M NaOH . Este tampão deve ter pH igual a 7.2.

Protocolo experimental para preparação de biomassa para os ensaios de CBO

1. Centrifugar a biomassa de forma a retirar o “meio de cultura” (para otimizar a centrifugação pode-se deixar sedimentar e em seguida decantar, de forma a concentrar a biomassa.) Meia ampola tem, aproximadamente, 8g de biomassa.
2. Decantar e re-suspender a biomassa em tampão fosfato 0.1M^1 .
3. Colocar a suspensão em agitação 20/30 min de forma a “lavar” a biomassa e retirar os nutrientes presentes no meio de cultura.
4. Repetir o ponto 2 e 3 (três ou mais vezes).
5. Agitar 12h na incubadora de CBO (durante a noite)

Depois de decantar, pesar a biomassa (precipitado da centrifugação) e re-suspender de forma a obter uma solução de biomassa em tampão fosfato de 333g/L de tampão (3ml de tampão por grama de biomassa).

¹ Solução tampão fosfato: Pesar 13.8 gramas de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 2 gramas de NaOH e dissolver em 1 L de H_2O . Corrigir o pH para 6.9-7.1 com NaOH .

Protocolo experimental para determinação de Fenóis Totais

O protocolo experimental para determinação dos fenóis totais no efluente do cozimento da cortiça e nas frações antes e após ozonização foi baseado na técnica proposta por Makkar *et al.* (1993) com algumas adaptações. Esta quantificação é baseada no reagente *Folin-Ciocalteu*.

Soluções padrão:

1. Preparar soluções padrão com concentrações entre 0 a 25 mg L⁻¹ e adicionar um volume igual a 2 mL aos tubos.
2. Adicionar 1 mL de reagente *Folin-Ciocalteu* em cada tubo e agitar no vortex.
3. Adicionar 5 mL de solução de NaCO₃ (20%), agitar bem e deixar à temperatura ambiente, no escuro, durante 40 minutos.
4. Passados 40 minutos, ler as absorvências das amostras a 765 nm, realizando o zero com o branco.
5. Com os resultados pode construir-se a reta de calibração.

Amostras:

1. Realizar as diluições de amostras pretendidas e adicionar 2 mL das mesmas nos tubos.
2. Proceder do mesmo modo que nas soluções padrão.
3. Ler as absorvências das amostras a 765 nm, sendo a concentração de fenóis totais estimada pela reta de calibração.

Reagentes:

- ✓ Reagente *Folin-Ciocalteu* (1 N): o reagent comercial *Folin-Ciocalteu* é diluído no mesmo volume de água destilada. A solução resultante deve ser conservada no escuro a 4 °C envolta em papel de alumínio.
- ✓ Solução de carbonato de sódio, NaCO₃ (20 %): dissolver 50 g de carbonato de sódio (NaCO₃.10H₂O) em água destilada e transferir para um balão volumétrico de 250 mL, perfazendo o volume com água destilada.
- ✓ Solução padrão de ácido tânico (0.5 mg mL⁻¹): dissolver 25 mg de ácido tânico em água destilada e transferir para um balão volumétrico de 50 mL, sendo o restante volume perfeito com água destilada. Esta solução só deve ser preparada para utilização imediata.

Anexo 2

Neste anexo encontra-se descrito a composição do meio da biomassa aeróbia.

Composição do meio de biomassa aeróbia

Tabela A1: Descrição da composição do meio da biomassa aeróbia.

| Substâncias | Concentrações |
|--|---------------------------|
| Macro-nutrientes ¹ | 0.5 mL L ⁻¹ |
| Micro-nutrientes ² | 0.5 mL L ⁻¹ |
| NH ₄ Cl | 0.017 g L ⁻¹ |
| NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O | 0.037 g L ⁻¹ |
| Na ₂ SO ₄ | 0.030 g L ⁻¹ |
| Glucose | 1.8 g L ⁻¹ |
| NaHCO ₃ ³ | 3.7 - 4 g L ⁻¹ |
| HCl 37% | 0.09 mL L ⁻¹ |

¹ Composição: 27.7 g L⁻¹ of CaCl₂, 101 g L⁻¹ of MgSO₄.7H₂O and 4.84 g L⁻¹ of FeCl₃.6H₂O.

² Composição: 40 mg L⁻¹ of MnSO₄.H₂O, 57 mg L⁻¹ of H₃BO₃, 43 mg L⁻¹ of ZnCl₂, 35 mg L⁻¹ of (NH₄)₆MO₇O₂₄, 100 mg L⁻¹ of FeCl₂.4H₂O and 100 mg L⁻¹ of EDTA.

³ Esta quantidade é ajustável até se atingir um pH neutro entre 7 e 8

Anexo 3

Neste anexo são apresentadas as retas de calibração obtidas para a quantificação dos fenóis totais, segundo Makkar *et al.* (1993), e para a quantificação de compostos fenólicos por HPLC-DAD.

Reta de calibração para quantificação de Fenóis Totais

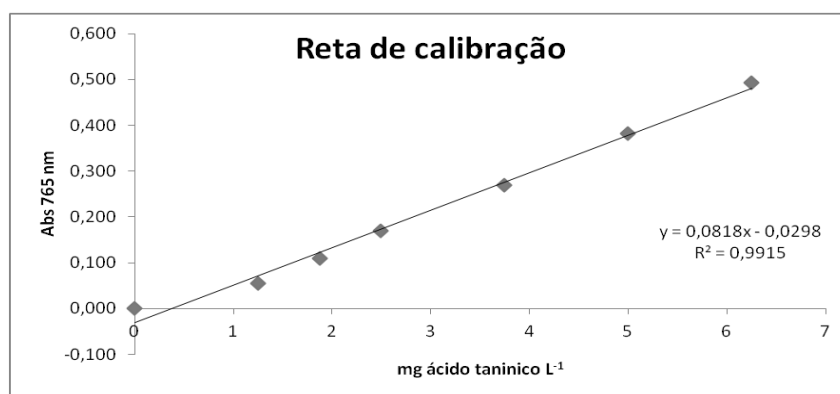


Figura A1 Reta de calibração utilizada para quantificação de Fenóis Totais

Retas de calibração para quantificação de Compostos Fenólicos

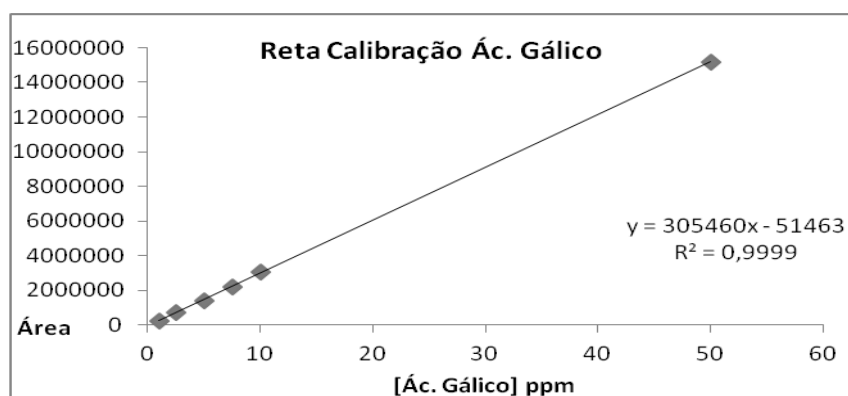


Figura A2 Reta de calibração utilizada para quantificação do ácido gálico

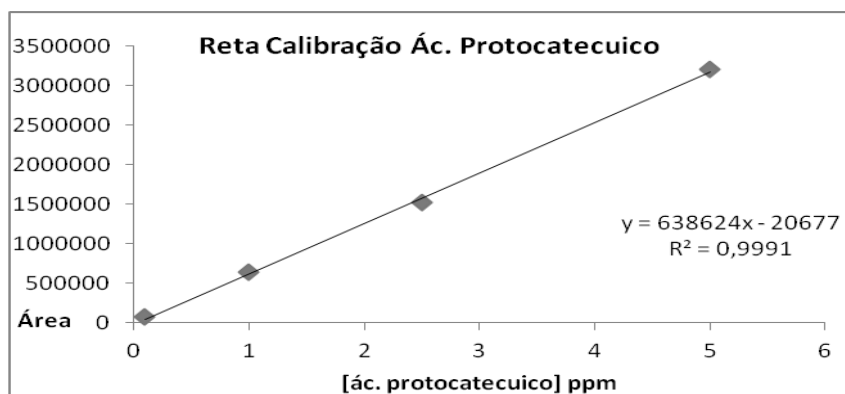


Figura A3 Reta de calibração utilizada para quantificação do ácido protocatecuico

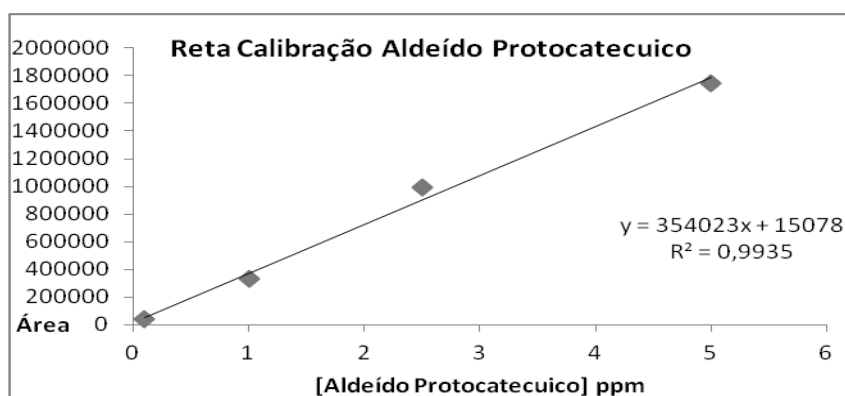


Figura A4 Reta de calibração utilizada para quantificação do aldeído protocatecuico

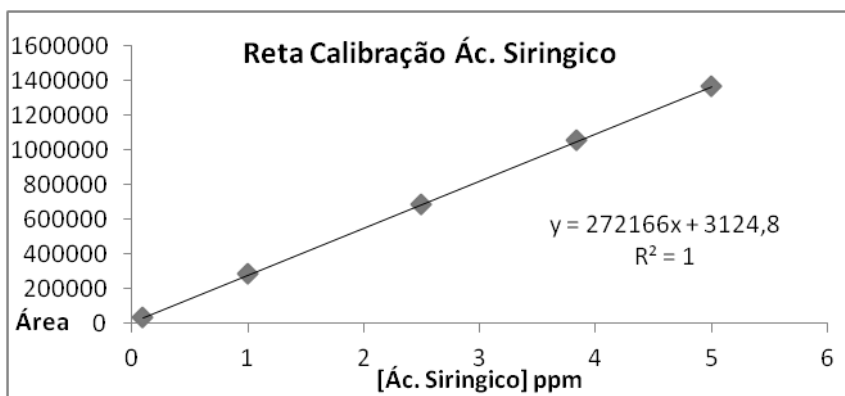


Figura A5 Reta de calibração utilizada para quantificação do ácido siringico

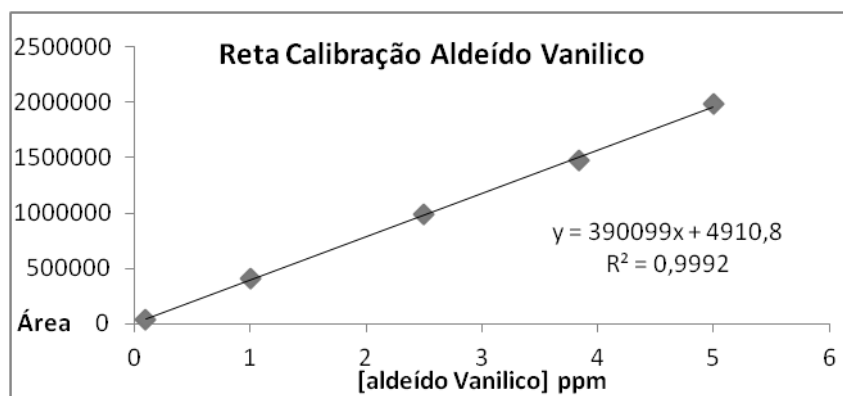


Figura A6 Reta de calibração utilizada para quantificação do aldeído vanílico

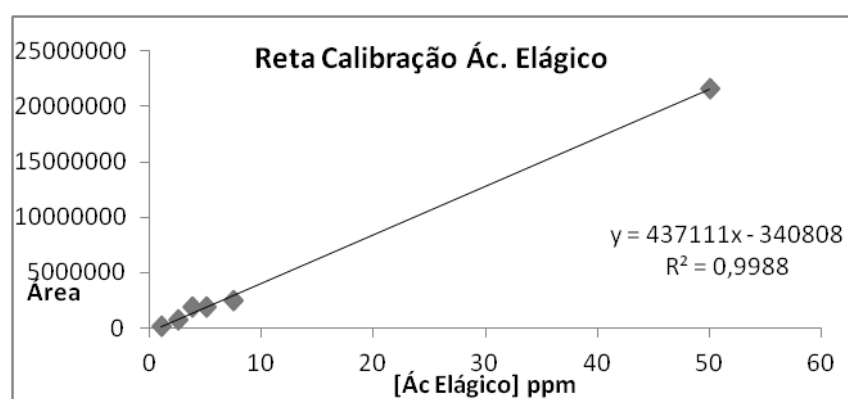


Figura A7 Reta de calibração utilizada para quantificação do ácido elágico

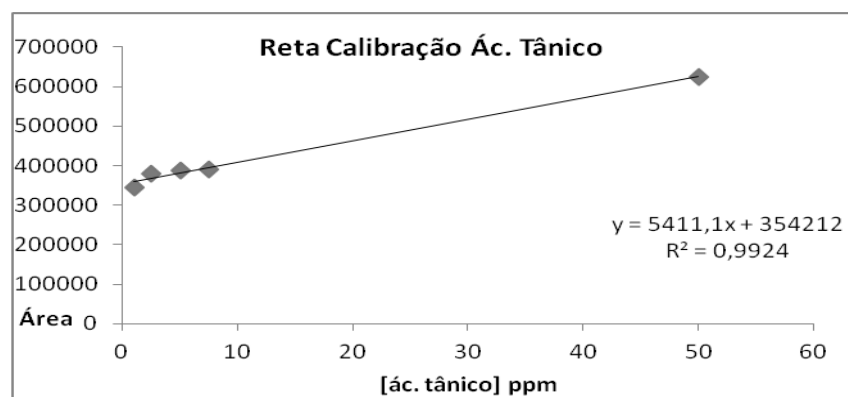


Figura A8 Reta de calibração utilizada para quantificação do ácido tânico

Anexo 4

Neste anexo são apresentadas as correlações entre a CQO, os fenóis totais e a cor dos permeados obtidos no processamento sequencial com o coeficiente de exclusão molecular das membranas.

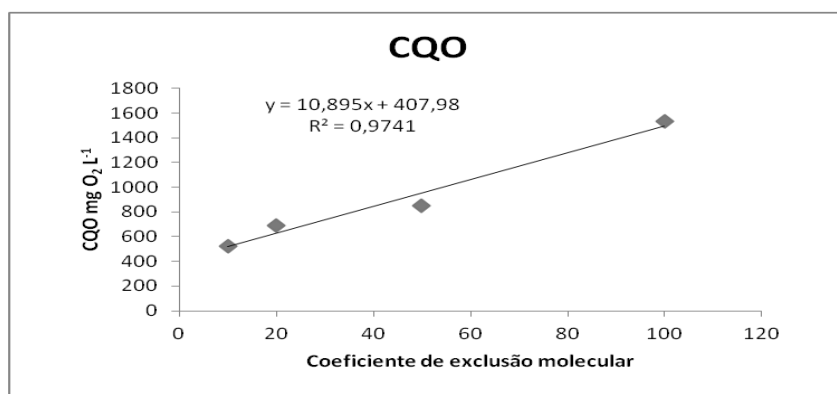


Figura A9 Correlação entre a CQO dos permeados obtidos no processamento sequencial de UF e o coeficiente de exclusão molecular

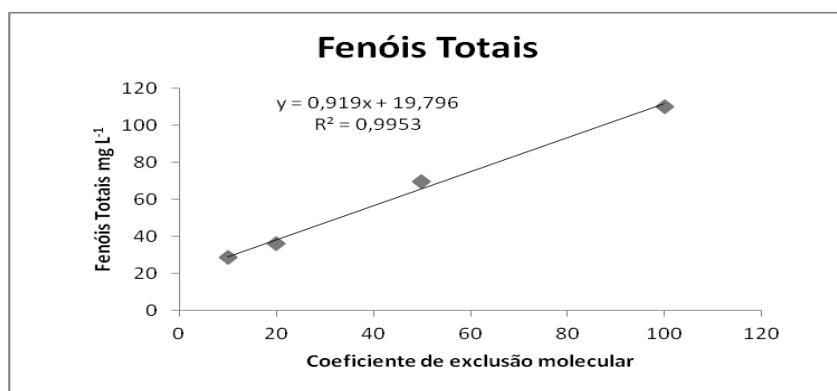


Figura A10 Correlação entre os fenóis totais dos permeados obtidos no processamento sequencial de UF e o coeficiente de exclusão molecular

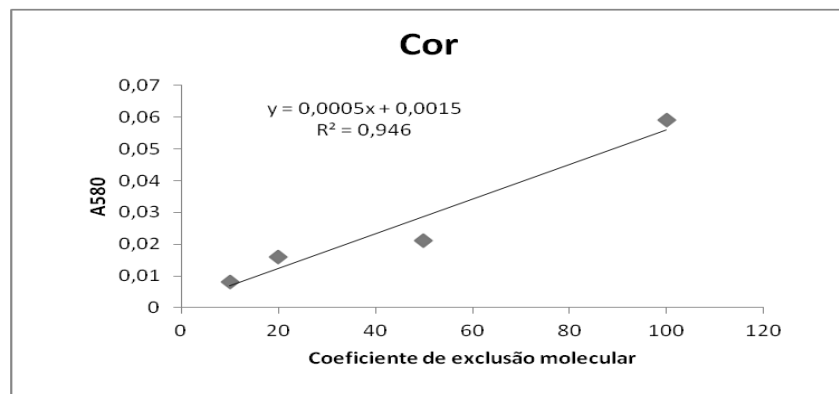


Figura A11 Correlação entre a cor dos permeados obtidos no processamento sequencial de UF e o coeficiente de exclusão molecular